Bakterielle Antikörper bei chronischer Bronchitis

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von

Rolf Kronenbürger

und

Walter Huber

Saarbrücken

1970

Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie
der Universität des Saarlandes, Homburg (Saar)
Direktor: Prof.Dr.med.Dr.phil.Dipl.Chem. W. Zimmermann

BAKTERIELLE ANTIKÖRPER BEI CHRONISCHER BRONCHITIS

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Hohen Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes

vorgelegt von
Rolf Kronenbürger
und
Walter Huber

Dekan: Prof.Dr.med. G. Dhom
Referent: Prof.Dr.med.,Dr.phil.,Dipl.Chem. W. Zimmermann

Promotionsdatum: 9. I. 197o

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung und Fragestellung

II. Bisherige Literatur zum Thema

III. Material und Methodik

1. Gewinnung der Keime
2. Gewinnung von Serum
3. Die indirekte Hämagglutination
   a) Vorbemerkungen
   b) Herstellung der Antigenaufschwemmung
   c) Beladung der Erythrozyten
   d) Bestimmung der Antikörpertiter
4. Die fluoreszenzmikroskopische Antikörperbestimmung
   a) Vorbemerkungen
   b) Das Mikroskop
   c) Beschreibung der eigenen Methodik
5. Die fluoreszenzmikroskopische Bestimmung der Gammaglobulinfraktionen
6. Die Komplementbestimmung

IV. Ergebnisse eigener Untersuchungen

1. Die gefundenen Keime, ihre Häufigkeit und Verteilung
2. Ergebnisse der Titerbestimmungen mit Hilfe der indirekten Hämagglutination
3. Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopischen Bestimmungen der Antikörper (Verlaufskontrollen) und Gammaglobulinfraktionen, sowie die Ergebnisse der Komplementbestimmungen
   a) Vorversuche
   b) Hauptversuche
4. Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopischen Einmalbestimmung der Antikörper

V. Diskussion der Ergebnisse und Schlussfolgerungen

1. Häufigkeit bakterieller Bronchialsekrete
2. Erregerkombinationen

3. Die einzelnen Erreger
   a) Hämophilus influenzae
   b) Pneumokokken
   c) Neisseria catarrhalis
   d) Staphylokokken
   e) Proteus, Cloaca, Pseudomonas, E. coli und Klebsiella
   f) Die übrigen Erreger

4. Zusammenfassende Beurteilung der Bakterien

5. Die Gammaglobuline

6. Das Komplement

VI. Zusammenfassung

VII. Autorenverzeichnis

I. Einleitung und Fragestellung

Nach der von FLETCHER (1961) vorgeschlagenen und heute weitgehend anerkannten Definition liegt eine chron. Bronchitis dann vor, wenn jemand in 2 aufeinanderfolgenden Jahren mindestens 3 Monate lang jährlich Husten und Auswurf hat, soweit unspezifische bronchopulmonale Erkrankungen die Ursachen sind.

Wie K. Ph. BOPP (1968) auf dem Symposion über die chronische Bronchitis im März 1968 in Bad Ems ausführte, hat die Mortalität der chronischen Bronchitis, bzw. ihrer Folgezustände, in den letzten Jahrzehnten um mehr als 100 % zugenommen.

Bedenkt man, dass in der gleichen Zeit nicht nur der Verbrauch an baktericiden und bakteriostatischen Mittel enorm gestiegen ist, sondern auch noch wirksamere Medikamente entwickelt worden sind, dann fällt es schwer zu glauben, dass Bakterien bei der chron. Bronchitis eine bedeutende Rolle spielen sollen.

Zumindest müssen andere endogene oder exogene Faktoren bei der Entstehung der chronischen Bronchitis eine wichtigere Rolle spielen als bei den übrigen bakteriellen Infektionskrankheiten, die ja mit zunehmender Verwendung von Antibiotika zurückgegangen sind.

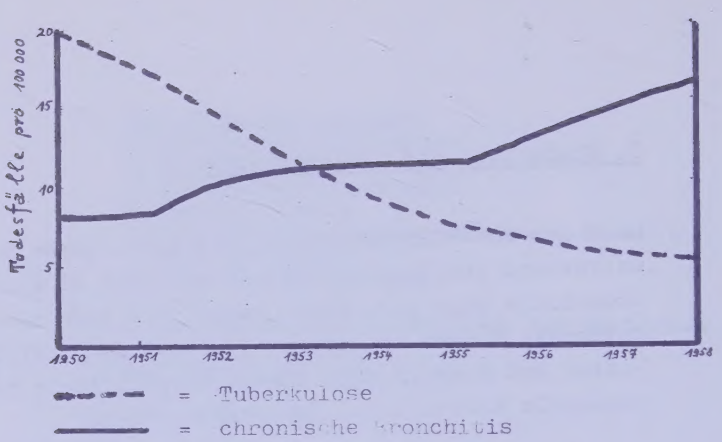


Abbildung 1: Mortalität der Tuberkulose und der chronischen Bronchitis von 1950 bis 1958 in Kalifornien (n. HERZOG 19..).

PROTIVINSKY (1960) berichtet, daß die Sterblichkeit an Bronchitis und ihren Folgezuständen im industrialisierten England etwa zehnmal höher ist als in landwirtschaftlich ausgerichteten Ländern wie Dänemark und Norwegen.

Dies läßt den Schluß zu, daß die Ursache für das Zunehmen der chronischen Bronchitis sicherlich in erster Linie durch die zunehmende Industrialisierung mit der daraus resultierenden Verschmutzung der Luft bedingt sein könnte.

Jedoch dürfte auch der zunehmende Verbrauch von Tabak als zusätzliche Schädigung eine maßgebliche Rolle spielen. Ist doch bewiesen (BALLENGER 1960), daß bereits der Rauch weniger Zigaretten die Cilientätigkeit lähmt, wodurch der Selbstreinigungsmechanismus der Lunge weitgehend ausgeschaltet wird.

Da jedoch nicht alle Raucher oder in besonders verschmutzter Luft lebende Menschen zwangsläufig eine chronische Bronchitis bekommen, muß sicherlich auch eine gewisse endogene Bereitschaft mitwirken.

SCHMIDT (1965) nennt an endogenen Faktoren vor allem die Mukoviszidose (bei heterozygotem Erbgang) und die allergische Diathese; BOPP (1966) rückt Enzymdefekte wie z.B. alpha-Antitrypsin-Mangel und die Hypogammaglobulinämie in den Vordergrund, während HERBERG (1966) eine gewisse Hyperreaktivität der Bronchien nennt, die bei Einatmung von Kaltluft oder Staub einen Spasmus der Bronchialmuskulatur bewirke.

Während vermutlich manche der endogenen Dispositionen auch ohne weitere Schädigungen zwangsläufig eine chronische Bronchitis entstehen lassen, deutet aber doch gerade ihre Zunahme in den letzten Jahrzehnten, verbunden mit einer signifikanten Mehrzunahme in Industriegebieten, darauf hin, dass oft erst jahrelanges kontinuierliches Einwirken schädigender Noxen, wie Tabakrauch, stark verschmutzte Luft oder toxische Gase und Dämpfe, die chronische Bronchitis hervorruft.

Ihre Pathogenese kann man sich dann etwa folgendermassen vorstellen (HERBERG 1966): Durch den dauernden Reiz resultiert einmal eine Hypersekretion der Becherzellen und Schleimzellen im Bronchialbaum, zum anderen ein Erlahmen der Cilien des Flimmerepithels. Die Folgen davon sind Sekretretention und Verstopfung des freien Lumens der kleinen Luftwege. Hinzu kommen Schleimhautödeme und Spasmen der glatten Muskulatur. Diese geschädigte Schleimhaut aber, zusammen mit dem gestörten Selbstreinigungsmechanismus der Bronchien infolge Sekretstauung, sind gute Voraussetzungen für das Angehen viraler Infekte, die ihrerseits wiederum Schlepperdienste leisten können für eine bakterielle Invasion. SCHMIDT (1965) drückt es so aus, dass die Viren das Gewebe "aufschliessen" für die Bakterien.

Neben dieser primär schleichenden Entstehung können auch andere Faktoren, wie angeborene oder erworbene Bronchiektasen, Lungenemphyseme, primäre Brustkorbdeformitäten, postpneumonische oder posttuberkulöse Zustände, chronische Entzündungen der Nasennebenhöhlen, sowie, bei entsprechender endogener Disposition, auch einmalige akute Erkältungszustände in das Krankheitsbild der chronischen Bronchitis einmünden. Aber bei diesen Entstehungsursachen ist sicherlich nicht der Grund für das Ansteigen der chronischen Bronchitis in den letzten Jahrzehnten zu suchen.

Wenngleich also den Bakterien für die eigentliche Entstehung der chronischen Bronchitis keine grosse Bedeutung zugemessen werden kann (eine Entstehung durch bakterielle Allergie wird noch diskutiert, FINDEISEN und WEMMER 1962), ist jedoch ihre Bedeutung für den weiteren Verlauf des Krankheitsbildes unbestritten. Unter ihrer Einwirkung kommt es zu immer wieder auftretenden Infektrezidiven mit Husten und Auswurf, die für das Krankheitsbild der chronischen Bronchitis charakteristisch sind.

Pathologisch anatomisch resultiert aus den immer wiederkehrenden Infektionen eine Hypertrophie der Becherzellen und ein Ersatz der Flimmerzellen durch Becherzellen. Die Bronchiallumina werden durch Eitermassen und einwachsendes, organisierendes Bindegewebe immer mehr eingeengt. Diese Obstruktion der Bronchien aber ist die Ursache für die Entstehung irreversibler Schäden: In der Exspirationsphase kann die Luft nicht mehr vollständig aus den Alveolen heraus, inspiratorisch hingegen werden die Alveolen immer weiter aufgebläht. Folge davon ist, dass die zarten Alveolarsepten einreissen. Es entsteht das obstruktive, substantielle Emphysem.

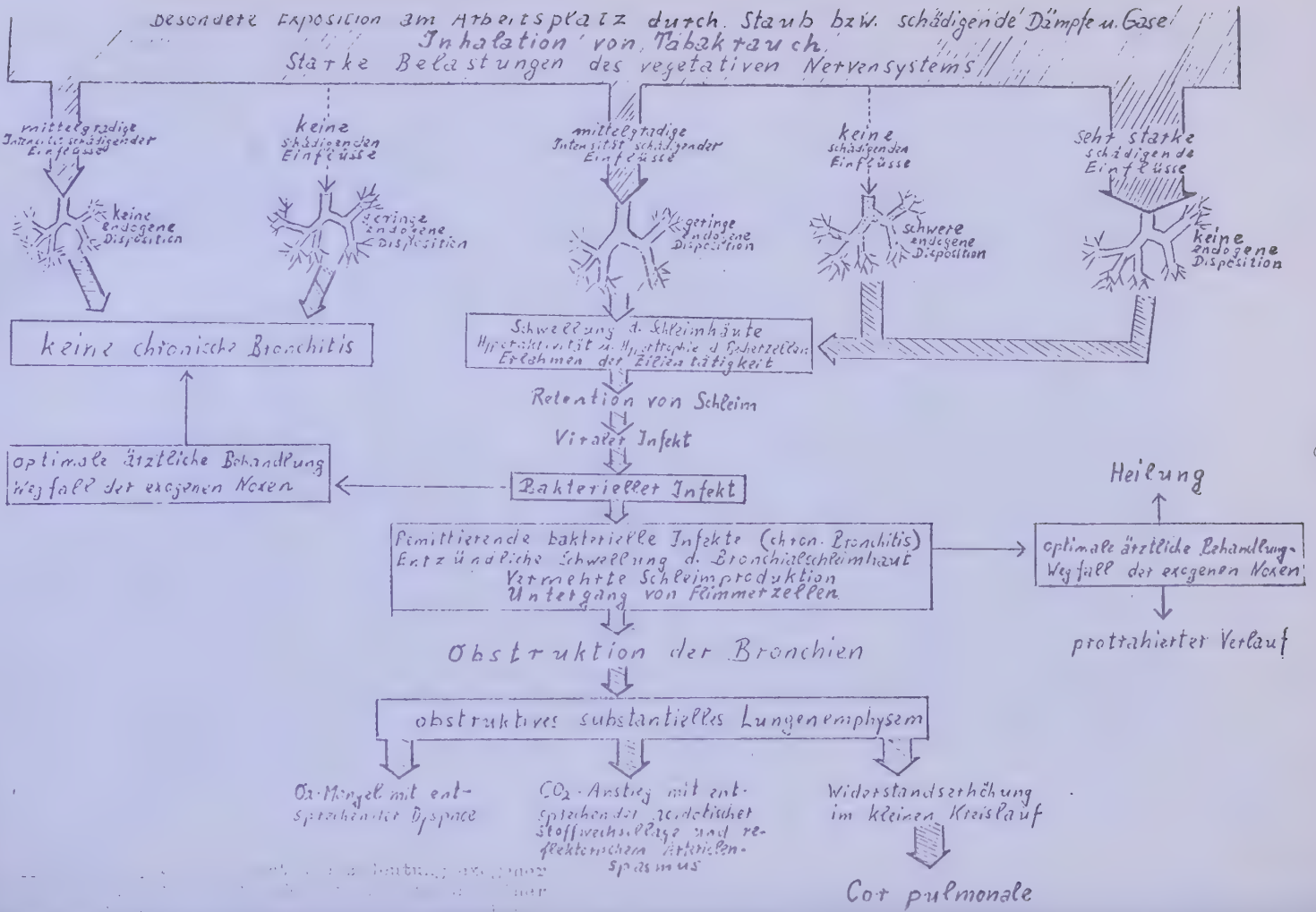
Mit fortschreitendem Schwund von Alveolarsepten wird einmal die Aufnahme von Sauerstoff und die Abgabe von Kohlenstoffdioxyd eingeschränkt, was zur Dyspnoe und Erhöhung der Kohlensäurespannung im Blut führt, zum anderen wird durch die Reduzierung der kapillaren Strombahnen der Widerstand im kleinen Kreislauf erhöht, was mit der Zeit zur Hypertrophie und schliesslich zur Dilatation des rechten Herzens führt, zum Cor pulmonale. Die Vergrösserung des Residualvolumens, die infolge der erhöhten Kohlenstoffdioxyd-Spannung verursachte reflektorische spastische Kontraktion der Arteriolen, und die Schwellung der Bronchialschleimhäute infolge der sich bildenden Kollateralkreisläufe vervollständigen den circulus vitiosus.

Zusammenfassend kann man also zur Rolle der Bakterien bei der chronischen Bronchitis folgendes sagen:

1. Eine primär ätiologische Bedeutung kommt ihnen kaum zu, da sie im allgemeinen nur auf einer durch endogene und exogene Faktoren bereits vorgeschädigten Bronchialschleimhaut einen chronischen Infekt aufrecht erhalten können.

2. Ist der chronische Infekt jedoch einmal manifest, so sind in erster Linie die remittierenden infektiösen Schübe für die mehr oder weniger progrediente Entwicklung zu irreversiblen Schäden an Lunge und Herz verantwortlich.

Wenn aber trotz der entscheidenden Mitbeteiligung der Bakterien die chronische Bronchitis gerade im Zeitalter der Antibiotika so drastisch zugenommen hat, muss die Suche nach optimaleren Behandlungsmöglichkeiten der remittierenden bakteriellen Infektionen als ein sehr ernstes Problem angesehen werden.


Besondere Exposition am Arbeitsplatz durch Staub bzw. schädigende Dämpfe u. Gase
Inhalation von Tabakrauch
Starke Belastungen des vegetativen Nervensystems
mittelgradige Intensität schädigender Einflüsse
keine endogene Disposition
keine schädigenden Einflüsse
geringe endogene Disposition
mittelgradige Intensität schädigender Einflüsse
geringe endogene Disposition
keine schädigenden Einflüsse
schwere endogene Disposition
sehr starke schädigende Einflüsse
keine endogene Disposition
keine chronische Bronchitis
Schwellung d. Schleimhäute
Hyperaktivität u. Hypertrophie d. Becherzellen
Erlahmen der Zilientätigkeit
Retention von Schleim
Viraler Infekt
optimale ärztliche Behandlung
Wegfall der exogenen Noxen
Bakterieller Infekt
Heilung
optimale ärztliche Behandlung
Wegfall der exogenen Noxen
protrahierter Verlauf
Sämittierende bakterielle Infekte (chron. Bronchitis)
Entzündliche Schwellung d. Bronchialschleimhaut
Vermehrte Schleimproduktion
Untergang von Flimmerzellen
Obstruktion der Bronchien
obstruktives substantielles Lungenemphysem
Ox-Mangel mit entsprechender Dyspnoe
CO_2-Anstieg mit entsprechender acidotischer Stoffwechsellage und reflektorischem Arteriolenspasmus
Widerstandserhöhung im kleinen Kreislauf
Cor pulmonale

Eine optimale antibiotische Behandlung ist aber nur möglich, wenn die für die Infektion verantwortlichen Keime bekannt sind. Das festzustellen ist jedoch bei der chronischen Bronchitis nicht ganz einfach. Wegen der bereits angeführten grossen Bedeutung endogener und exogener Faktoren für das Zustandekommen der chronischen Bronchitis, kann die Koch'sche Trias hier nur schwer oder garnicht erfüllt werden. Einzige Kriterien zur Beurteilung der Pathogenität einzelner Keime sind ihr Vorkommen im Sputum chronischer Bronchitiker, sowie signifikante Besserungen im Krankheitsbild nach Gabe von Antibiotika.

An der Unvollkommenheit dieser Kriterien mag es liegen, dass auch die Meinungen der Autoren in Bezug auf die Pathogenität der einzelnen Keime so stark differieren, Während vorwiegend englische Forscher (FRANCIS et al. 1964; GOSLINGS et al. 1961; NEVILLE 1967) fast ausschliesslich den Keimen Hämophilus influenzae und Pneumokokken pathogene Bedeutung beimessen, sprechen andere (THURNER 1950; BRÜHL und Mitarb. 1967; PROTIVINSKY 1966) auch dem Mikrokokkus catarrhalis, den hämolisierenden Streptokokken, dem Staphylokokkus aureus und vor allem den negativen Stäbchen die Fähigkeit zu, bronchitische Infektionen zu unterhalten.

Diese Frage ist durchaus nicht nur von theoretischem Interesse, wenn man bedenkt, dass einerseits die heute bei der chronischen Bronchitis üblicherweise empfohlenen Antibiotika Ampicillin, Tetracyklin und Chloramphenicol gerade gegen einige negativen Stäbchen nicht oder nur ungenügend wirksam sind, andererseits aber an manchen Orten die bakteriologische Sputumuntersuchung mit nachfolgender Resistenzbestimmung immer mehr in Mißkredit gerät (BUCHER 1965), ja, sogar für wertlos gehalten wird (NEVILLE 1967).

Es schien uns deshalb interessant, zu prüfen, ob sich nicht durch den Nachweis spezifischer Serumantikörper vielleicht mehr darüber aussagen liess, welchen von den Keimen, die aus dem Bronchialbaum der Patienten gezüchtet werden konnten, eine pathogene Bedeutung zukommt, und welchen nicht.

Wir gingen dabei von der Erfahrungstatsache aus, dass die Fähigkeit bakterieller Keime, unter natürlichen Infektionsbedingungen spezifische Antikörper zu bilden, als ein Kriterium für ihre Pathogenität gedeutet werden kann.

Unsere Aufgabe musste somit darin bestehen, mit geeigneten Methoden nachzuweisen, welche der im Bronchialbaum gefundenen Keimarten im menschlichen Organismus die Bildung von Antikörpern bewirkt haben.

II. Bisherige Literatur zum Thema

Der Versuch, spezifische Serumantikörper bei chronischen Bronchitikern nachzuweisen, ist bisher von 3 Autoren gemacht worden.

1959 untersuchte A.A. GLYNN (1959) im St. Mary's Hospital in London 9o Patienten mit chronischer Bronchitis und 33 mit Asthma auf Serumantikörper gegen Haemophilus influenzae. Seine Ergebnisse veranschaulicht die folgende Tabelle.

Tabelle 1: Antikörpertiter gegen Haemophilus influenzae bei Bronchitikern, Asthmatikern und Kontrollpersonen. (Nach GLYNN 1959)

Titer	Zahl der untersuchten Personen		
	Bronchitiker	Asthmatiker	Kontroll-personen
8ooo-16ooo	5	0	0
2ooo- 4ooo	33	1	1
5oo- 1ooo	21	6	2
125- 25o	1o	4	9
25	21	22	38
Total: 173	9o	33	5o

1965 untersuchte R. MAY im 'Institute of Diseases of the Chest' in London 41 Patienten mit chronischer Bronchitis auf Serumantikörper gegen Haemophilus influenzae. Seine Ergebnisse spiegeln sich in der folgenden Tabelle wieder.

Tabelle 2: Agglutinationstiter gegen die verschiedenen Typen der S-Form von Haemophilus influenzae. (Nach MAY 1965)

Beschaffenheit der Sputen	Anzahl der Patienten	Serumtiter mit Aufschwemmungen der Typen a - f der S-Form					
		a	b	c	d	e	f
eitrig	1	1o	5o	5o	5o	5o	25o
	27	1o	25o	5o	1o	1o	5o
	28	5o	25o	25o	5o	1o	5o
	3o	5o	25o	5o	5o	5o	5o
	32	5o	25o	5o	5o	5o	5o
	34	5o	25o	5o	5o	1o	5o
schleimig	31	1o	25o	1o	5o	1o	1o

MAY stellte nur Serumverdünnungen von 1:1o, 1:5o und 1:25o her. Wie aus Tabelle 2 zu ersehen ist, fand er bei 7 von 41 Patienten einen Antikörpertiter von 25o gegen die S-Form (vorwiegend Typ b) von Haemophilus influenzae.

Gegen die Typen der R-Form von Haemophilus influenzae fand MAY bei 2o von 41 Patienten einen Antikörpertiter von 25o.

Sowohl GLYNN als auch MAY bedienten sich der indirekten Hämagglutination für den Nachweis der Antikörper. Beide benutzten jedoch zur Sensibilisierung der Erythrozyten nicht Antigen von patienteneigenen Bakterien, sondern von anderweitig gewonnenen Stämmen.

1966 untersuchten P. BRÜHL und Mitarbeiter im Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität des Saarlandes 12 Patienten mit chronischer Bronchitis auf Serumantikörper gegen Escherichia coli. In 7 Fällen waren die Titer bei Verwendung von Antigen patienteneigener Bakterien um mindestens 4 Stufen höher als bei den negativen Kontrollen.

Bisher wurden also Antikörper nachgewiesen gegen Hämophilus influenzae und E. coli.

Ausgehend von der Entdeckung, dass der Bronchialbaum eines gesunden Menschen steril ist (BRUMFITT und Mitarb. 1957; CORREL und Mitarb. 1959), versuchten viele Autoren durch bakterielle Sputumuntersuchungen Aufschluss darüber zu erhalten, welche Erreger verantwortlich sind für den chronisch-bronchitischen Infekt.

Die gefundenen Ergebnisse waren sehr unterschiedlich, was sicherlich nicht zuletzt auf die Verschiedenheit der Sputumgewinnung und Sputumverarbeitung zurückzuführen ist (siehe Abschnitt Material und Methodik). Wie bereits erwähnt, musste auch der Aussagewert in Bezug auf die aktuelle Pathogenität der gefundenen Keime begrenzt sein, da es sich ja auch weitgehend um saprophytäre Begleitkeime handeln konnte.

In Tabelle 3 sind die bakteriologischen Sputumbefunde von 9 verschiedenen Autoren zusammengestellt. Die Tabelle lässt gut erkennen, wie sehr es von der Art der Sputumgewinnung und Sputumverarbeitung abhängt, welche Ergebnisse man erzielt.

Tabelle 3. Bakteriologische Befunde bei chr. Bronchitis
(Ein Vergleich der Ergebnisse verschiedener Autoren und Untersuchungsmethoden). Mod. n. Bucher(1965)

Methode	A		B			C			D	E
Autor	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Anzahl der Fälle: davon mit:	50 %	277 %	736 %	470 %	30 %	25 %	23 %	78 %	125 %	34 %
Streptococcus viridans....	22	96	70	95	93	–	–	71	–	-
Neisseria catarrhalis.....	32	22	69	27	88	–	–	30	34	-
Pneumococcus..............	18	4	60	10	33	24	39	9	63	63
Klebsiela pneumoniae......	12	–	16	–	10	–	–	–	2	-
Hämophilus influenzae.....	2	10	13	11	40	76	65	19	72	27
Paracolobactrum coliforme.	–	–	12	–	–	–	–	–		
Anhämolyt. Streptokokken..	–	–	11	–	88	–	–	–		
Diphtheroide Stäbchen.....	–	6	11	1	17	–	–	–		
Micrococcus tetragenes....	2	–	11	–	–	–	–	–		
Streptococcus pyogenes....	2	1	10	3	–	–	4	–	2	
Staphylococcus aureus.....	–	12	9	15	13	4	4	10	20	27
Escherichia coli..........	4	14	7	6	–	–	–	–	3	1
Fusobacterium fusiforme...	–	–	7	–	–	–	–	–		
Candida albicans..........	–	–	6	–	–	–	–	–	1	
Proteus vulgaris..........	2	47	4	32	–	–	–	–	5	12
Enterococcus..............	–	–	3	–	–	–	–	–	1	1
Pseudomonas aeruginosa....	–	–	2	–	–	–	–	–	2	1
Staphylococcus albus......	2	73	1	38	7	–	–	–		
Andere....................	–	–	5	–	10 x)	16 x)	13 x)	–	5	

Autoren:
1 Howell (1951)
2 Findeisen und Wemmer (1962)
3 [illegible] (19[illegible])
4 Findeisen und Wemmer (1962)
5 May (1958)
6 Brumfitt und Mitarb. (1957)
7 Lees und [illegible] (1[illegible])
8 Korockan[illegible]s (1959)
9 Bucher (1960)
10) Gernez-Rieux u. [illegible] (1967)

Methode:
A Globales Sputum; nur Kultur

B Ausgewaschenes Sputum; alle in der Kultur gewachsenen Erreger

C Aspiration durch Spezialbronchoskop

D Ausgewaschenes Sputum; Ausstrich und Kultur kombiniert

x) = nicht weiter differenzierte coliforme Stäbchen

III. Material und Methodik

Insgesamt wurden 126 Patienten (110 Männer, 16 Frauen) untersucht.

Von 93 Patienten (83 Männer, 10 Frauen) bestimmten wir einmalig den Antikörpertiter mit der Methode der indirekten Hämagglutination.

Von weiteren 8 Patienten (6 Männer, 2 Frauen) wurden Verlaufskontrollen der Antikörpertiter gemacht, wofür, in der Hoffnung, damit eine größere Empfindlichkeit zu erreichen, die fluoreszenzmikroskopische Methode gewählt wurde.

Bei 4 von diesen 8 Patienten wurden zusätzlich die einzelnen Fraktionen der Gammaglobuline fluoreszenzmikroskopisch bestimmt, und bei weiteren 5 Patienten (4 Männer, 1 Frau) noch Einmalbestimmungen der Antikörpertiter (ebenfalls mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie) vorgenommen.

Zusätzlich wurden bei 8 Patienten, bei denen Verlaufskontrollen der Antikörpertiter gemacht wurden, auch noch Verlaufskontrollen der Komplementtiter bestimmt.

Bei 20 Patienten wurden lediglich die Sputen bakteriologisch untersucht.

1. Gewinnung der Keime

Grundsätzlich gibt es 2 Möglichkeiten, Keime aus dem Bronchialbaum zu gewinnen:

a) aus dem Sputum
b) aus Bronchialsekret, das mit dem Bronchoskop, einem Katheter oder durch Punktion der Trachea gewonnen wurde.

Die Gewinnung der Keime aus dem Sputum hat den Vorteil, daß sie ohne größeren Aufwand und ohne Belastung für

den Patienten, somit beliebig oft, ausgeführt werden kann. Sie hat aber den Nachteil, dass dem Bronchialsekret bei seinem Transport nach aussen zwangsläufig Keime des Rachens und der Mundflora beigemengt werden.

Die Keimgewinnung aus unmittelbar mit dem Bronchoskop etc. entnommenem Material hat den Vorteil, dass eine Beimengung saprophytärer Keime des Rachens oder des Mundes kaum möglich ist. Der grosse Nachteil dabei ist aber, dass der Eingriff, der nur unter Lokalanästhesie ausgeführt werden kann, eine relativ grosse Belästigung für den Patienten bedeutet. Eine beliebige Wiederholbarkeit ist daher ausgeschlossen.

Bereits KITASATO (1892) hat darauf hingewiesen, dass sich das Bronchialsekret von Speichel und Rachenschleim trennen lässt, wenn man Sputumflocken wiederholt in physiologischer Kochsalzlösung wäscht. MULDER (1938) hat diese Methode noch weiter vervollkommnet und speziell für die bakterielle Untersuchung bei chronischer Bronchitis angewandt. BUCHER (1965) weist anhand umfangreicher vergleichender Untersuchungen nach, dass die Methode der Sputumwaschung, kombiniert mit gleichzeitiger Anfertigung und Bewertung von mikroskopischen Präparaten, durchaus genügend Sicherheit bietet für eine Beurteilung der bakteriellen Verhältnisse im Bronchialbaum.

Wir übernahmen daher in etwa die von BUCHER (1965) angegebene Technik, wobei im einzelnen wie folgt vorgegangen wurde:

Von jedem Patienten wurde auf einem Arbeitsbogen Name, Alter, Beruf und die Krankengeschichte (auszugsweise) vermerkt. Der Patient erhielt dann ein steriles Sputum-

röhrchen mit der Aufforderung, am nächsten Morgen vor dem Frühstück Bronchialsekret hineinzuexpektorieren.

Möglichst bis spätestens 2 Stunden nach der Expectoration wurde des Sputum dann in eine mit physiologischer Natriumchlorid-Lösung gefüllte Petrischale gegossen, und die makroskopische Beschaffenheit nach Aussehen und Viskosität notiert. Im Aussehen wurde zwischen schleimig, schleimig-eitrig und eitrig, in der Viskosität zwischen wässrig, dünnflüssig, dickflüssig und zäh unterschieden.

Nunmehr wurde eine grössere Flocke, die für die weitere Verarbeitung als besonders geeignet erschien (eitrige, kompakte Beschaffenheit, eventuell erkennbare Ausgüsse aus feinen Bronchialästen, sogenannte Curschmannsche Spiralen) mit der Platinöse aus dem übrigen Sputumverband gelöst und in eine zweite Petrischale mit physiologischer Natriumchlorid-Lösung überführt.

Hierin wurde die Flocke durch mehrmaliges Hin- und Herschlagen mit der Platinöse von Mundschleim gewaschen und in kleine Stückchen zerteilt. Die kompakten, grau-weissen oder eitrigen Partikel aus dem Bronchialbaum sinken dabei meist auf den Boden der Schale, während der Schleim und Speichel auf der Oberfläche schwimmen. Ein auf den Boden gesunkenes Partikelchen wurde nun in einer dritten und eventuell in einer vierten Petrischale so lange gewaschen, bis dem Bronchialsekret kein Speichel mehr anhaftete.

Eine etwa weizenkorngrosse, gut ausgewaschene Flocke wurde schliesslich in 3 Teile geteilt. Mit einem der 3 Flöckchen wurde zuerst mittels eines Methylenblau-Präparates sichergestellt, ob keine Plattenepithelien (vom Mund oder Rachen) mehr zu finden waren, und ob es Bakterien enthält. Erst wenn diese beiden Bedingungen erfüllt waren, wurden die beiden anderen Flöckchen verwertet. (Andernfalls wurde eine Flocke aus einer anderen

Stelle des Sputums ausgewaschen und untersucht). Und zwar wurde von dem zweiten Flöckchen ein Gram-Präparat angefertigt und von dem letzten eine Endo- und Blutagarplatte beimpft. Das Gram-Präparat wurde untersucht und das Ergebnis notiert. Die beimpften Platten wurden nach 24-stündiger Bebrütung (37° C) abgelesen, und die eventuell gewachsenen Keime durch Uberimpfen in Reinkultur gezüchtet und mit den üblichen Methoden diagnostiziert.

2. Gewinnung von Serum

Am Tag der Sputumverarbeitung wurden jedem Patienten 10 ml Venenblut entnommen. Das Blut wurde 5 min bei 2500 U/min zentrifugiert und das so gewonnene Serum bis zur weiteren Verwendung bei -70° C in der Tiefkühltruhe aufbewahrt.

3. Die indirekte Hämagglutination

a) Vorbemerkungen

LANDSTEINER (1945) beschrieb zum erstenmal die Entdekkung, dass Erythrozyten gewisse antigen wirkende Produkte bzw. Bestandteile von Bakterienzellen, an ihrer Oberfläche adsorbieren können, und, so behandelt, agglutinieren, wenn man die dem adsorbierten Antigen homologen Antikörper zugibt.

LANDSTEINER machte diese Entdeckung mit dem Vibrium comma. Man erkannte bald den Wert dieser Entdeckung und versuchte sie vor allem dort diagnostisch zu verwenden, wo man mit den üblichen serologischen Methoden des Antikörpernachweises nicht weiterkam.

MIDDELBROOK und DUBOS (1948) wandten die Methode bei Tuberkelbakterien an, KEOGH, NORTH u. WARBURTON (1947) bei Hämophilus influenzae. AMIES (1951) bei Pasteurella

pestis, NETER (1952) bei E.coli, HARRIS u. Mitarb. (1953), SACHSE (1955) und RÖMER (1956) (1960) (1961) bei Streptokokken. NETER (1965) stellte schliesslich fest, dass die indirekte Hämagglutination bei fast allen Bakterienarten angewandt werden kann.

WESTPHAL u. Mitarb. (1954) wiesen bei Versuchen mit dem Bakterium E.coli nach, dass es sich bei den an die Erythrozyten adsorbierten Substanzen um hochmolekulare, in Wasser meist kolloidal lösliche Lipopolysaccharide handelt, deren Lipoidkomponente etwa 25 - 40 %, und deren (phosphorylierte) Polysaccharidkomponente etwa 60 - 75 % ausmachen. Sie sind identisch mit den O-Antigenen (LÜDERITZ 1958).

Im nicht vorbehandelten Zustand ist die Affinität der O-Antigene zur Erythrozytenmembran nicht sehr gross. Man hat daher viele Versuche unternommen, ihre Affinität durch chemische oder physikalische Einwirkungen zu steigern. NETER (1956) fand heraus, dass die Affinität der O-Antigene zu Erythrozytenmembranen um mehr als das 100-fache steigt, wenn man sie 2 1/2 Stunden einer Hitzebehandlung in Phosphatpuffer von pH 7,2 (95-100°C) unterzieht, oder sie 5 min einer 25 n Alkalilösung von 56° C aussetzt. Das Teilchengewicht der Lipopolysaccharide wird bei dieser Behandlung von ursprünglich 10-20 Million auf einen relativ konstanten Wert von 200 000 reduziert (LÜDERITZ u. Mitarb. 1958). Ihre antigenen Eigenschaften gehen dabei nicht verloren.

Warum die Zellaffinität der Lipopolysaccharide bei der Hitze- oder Alkaliaktivierung so stark zunimmt, ist noch nicht geklärt. Arbeiten von NETER u. Mitarb. (1956) sowie LÜDERITZ u. Mitarb. (1958) machen es wahrscheinlich, dass bei der Aktivierung blockierende Gruppen vom Lipoidanteil abgespalten werden und dadurch die eigentlichen reaktionsfähigen Strukturen freigesetzt werden.

Die für eine positive Hämagglutination notwendige Minimalbeladung mit Hitze- oder Alkali-aktiviertem Lipopolysaccharid beträgt etwa 2 g pro 10^9 Erythrozyten. Die Maximalbeladung beträgt 39 ± 3 g pro 10^9 Erythrozyten, was einer Beladung mit ca. 1oo ooo Molekülen pro Erythrozyt entspricht (LÜDERITZ 1958).

Für die Dauer der Inkubation zur Anlegung der Lipopolysaccharide an die Erythrozyten erwies sich eine halbe Stunde bei 37° C als optimal (HARRIS u. Mitarb. 1953), und für die anschliessende Entfernung des überschüssigen Antigens erwiesen sich 3 Waschungen mit Natriumchlorid-Lösung einerseits als ausreichend, um alles nicht abgelagerte Antigen zu entfernen, andererseits führt es zu keinem messbaren Aktivitätsverlust bezüglich der Agglutinabilität (LÜDERITZ 1958).

Wir wählten zur Erhöhung der Affinität die Hitzebehandlung in Phosphatpuffer in der Modifikation nach BRÜHL u. Mitarb. (1967).

Von jedem Keim, der isoliert werden konnte, wurde der Antikörpertiter bestimmt, ausser bei dem Streptokokkus viridans. Nach übereinstimmenden Berichten von RÖMER (1957) und SACHSE (1955) ist die Anwendung der indirekten Hämagglutination bei diesem Keim nicht möglich.

b) Herstellung der Antigenaufschwemmung

Eine Traubenzuckerbouillon wurde mit der jeweiligen Reinkultur beimpft und 16 Stunden bei 37° C bebrütet. Von der bebrüteten Bouillon legten wir auf 3 Blutagarplatten Subkulturen an, die 24 Stunden bebrütet wurden. Die gewachsenen Bakterienrasen schwemmten wir mit 25 ml Phosphatpuffer (pH 7,2) ab, und kochten die Suspension 2 1/2 Stunden bei 1oo° C im Wasserbad. Anschliessend zentrifugierten wir sie bei 4ooo U/min über 2o min und

pipettierten dann das sich im Überstand befindliche rohe Extraktantigen (O-Antigen) ab. Es wurde bis zum weiteren Gebrauch bei -2o° C in der Kühltruhe aufbewahrt. Das Bakteriensediment wurde verworfen.

c) Beladung der Erythrozyten

Zur Sensibilisierung verwendeten wir menschliche O-Erythrozyten, die zuvor viermal mit Phosphatpuffer gewaschen wurden, um Serumreste zu entfernen. Mit den gewaschenen Erythrozyten und dem Antigenextrakt (Verdünnung 1:1o) stellten wir eine 2,5 %ige Suspension her und inkubierten diese 3o min bei 37° C im Wasserbad. Danach wurden die nunmehr sensibilisierten Erythrozyten dreimal in physiologischer Natriumchlorid-Lösung gewaschen, um überschüssiges Antigen zu entfernen, und schliesslich wieder mit Phosphatpuffer auf eine Konzentration von 2,5 % eingestellt.

d) Bestimmung der Antikörpertiter

Zur Titerbestimmung wurde das zuvor inaktivierte (3o min. bei 57° C im Wasserbad) Patientenserum mit dem Faktor 1/2 in geometrischer Reihe verdünnt: Zu o,2 ml Pufferlösung gaben wir o,2 ml Patientenserum, mischten gründlich und pipettierten jeweils o,2 ml dieser Mischung in die nächsten o,2 ml Pufferlösung, bis zu einer Serumverdünnung von 1:1o24. Zu jeder Serumverdünnung wurden dann o,2 ml der 2,5 %igen Erythrozytensuspension hinzugegeben.

Zu jedem Versuch wurden folgende Kontrollen mit angesetzt:

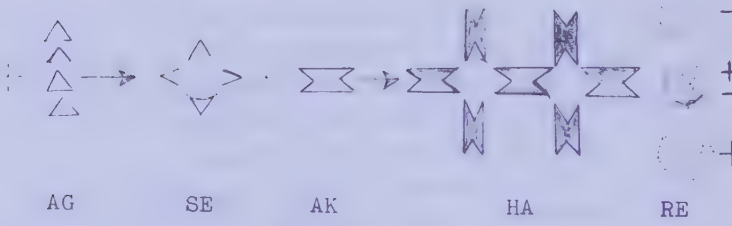
aa) Serum von 2 gesunden Menschen mit sensibilisierten Erythrozyten,

bb) Patientenserum mit nicht sensibilisierten Erythrozyten

cc) Pufferlösung mit sensibilisierten Erythrozyten.

Die Verdünnungsreihen blieben 3 Stunden bei Zimmertemperatur stehen und wurden dann auf ihre Hämagglutination überprüft. Notiert wurde der Titer, bei dem mit bloßem Auge noch eine deutliche Agglutination zu sehen war.

Eine schematische Darstellung der indirekten Hämagglutinationsmethode und der Reaktionsergebnisse ist in Abbildung 3 wiedergegeben.



Abkürzungen: E = Erythrozyt
AG = Antigen
SE = sensibilisierter Erythrozyt
AK = Antikörper
HA = Hämagglutination
RE = Reaktionsergebnisse (Sediment in Röhrchenkuppe)

Abbildung 3 zeigt eine schematische Darstellung der indirekten Hamag lutinationsmethode und der Reaktionsergebnisse (nach BRÜHL).

4. Die fluoreszenzmikroskopische Antikörperbestimmung

a) Vorbemerkungen

COONS u. Mitarb. (1954, 1958, 1959, 1960) schufen die Methode, mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern zu arbeiten. In ihr verbindet sich die hohe Nachweisempfindlichkeit fluoreszenzmikroskopischer Methoden mit der strengen Spezifität serologischer Verfahren. Das Prinzip dieser Methode ist, dass Antikörper mit fluoreszierenden Stoffen markiert werden und dadurch bei der Reaktion mit dem Antigen dieses zum Aufleuchten bringen. Umgekehrt können auch Antikörper mit markierten Antigenen fluoreszenzmikroskopisch sichtbar gemacht werden.

Eine besondere Variation der von COONS entwickelten Immunfluoreszenz ist die sogenannte Sandwichmethode (VOGT 1967), deren wir uns bedienten. Sie wird deswegen so genannt, weil mindestens drei Schichten übereinander liegen. Die unterste Schicht sind die Bakterien, gegen die Antikörper nachgewiesen werden sollen. Die zweite Schicht stellt das Patientenserum dar, in dem Antikörper vermutet werden. Die dritte Schicht bildet Antihumanglobulin, das mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) markiert ist.

Das Antihumanglobulin wird von der Ziege durch Immunisierung mit menschlichem Globulin gewonnen.

Das FITC ist die fluoreszierende Substanz. Es wird mit folgender Formel angegeben (HARMS 1967):

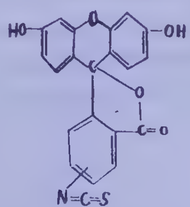


Abbildung 4: Die chemische

Die R-N=C=S Gruppe reagiert leicht mit der freien Aminogruppe der Proteine und zwar in der Form, daß ein H der Aminogruppe die Doppelbindung zwischen N und C auflöst. Es entsteht folgende Verbindung:

$$R\text{-}N{=}C{=}S + NH_2\text{-}CH_2\text{-Prot.} \longrightarrow R\text{-}NH\text{-}C\text{-}NH\text{-}CH_2\text{-Prot.}$$

Diese Umsetzung erfolgt anscheinend vorzugsweise an der Epsilon-Aminogruppe des Lysins (HARMS 1967). Das mit FITC markierte Antihumanglobulin ist im Handel erhältlich.

Der Reaktiospartner (Antigen) des markierten Antihumanglobulins sind die Antikörper im Patientenserum, die ja als Globuline auch antigene Eigenschaften haben gegenüber dem Antihumanglobulin. Im Prinzip beruht die Methode also auf zwei Ag-Ak-Reaktionen, bei der ein Reaktionspartner sichtbar markiert ist. Sind bakterielle Antikörper im Patientenserum, so reagieren diese zuerst mit den Bakterien der untersten Schicht. Das danach aufgetragene FITC markierte Antihumanglobulin hinwiederum wird sich nun an die Serumantikörper lagern und damit natürlich indirekt auch an die Bakterien. Die auf diese Weise indirekt mit FITC markierten Bakterien leuchten unter dem Fluoreszenzmikroskop auf.

Ein Waschvorgang vor dem Auftragen der 3. Schicht entfernt alle unspezifischen Globuline, die sich nicht an die Bakterien angelagert haben. Ein Waschvorgang nach dem Auftragen der 3. Schicht entfernt alles markierte Antihumanglobulin, das sich nicht an die Serumantikörper, und somit an die Bakterien angelagert hat. Dadurch wird gewährleistet, daß wirklich nur dann eine spezifische Fluoreszenz auftreten kann, wenn bakterielle

Serumantikörper vorhanden sind. Abbildung 6) soll dies verdeutlichen.

Im Gegensatz zur direkten Sandwichmethode, bei der die Antiseren selbst jeweils markiert werden, nennt man die oben geschilderte, von uns angewandte Methode die i n d i r e k t e Sandwichmethode. Beim indirekten Test wird der fluoreszenzserologische Antikörpernachweis dahingehend vereinfacht, dass nicht mehr für jedes Antigen ein individuelles Antiserum mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden muss. Es genügt für jede antikörperbildende Tierspezies ein markiertes Antiglobulinserum.

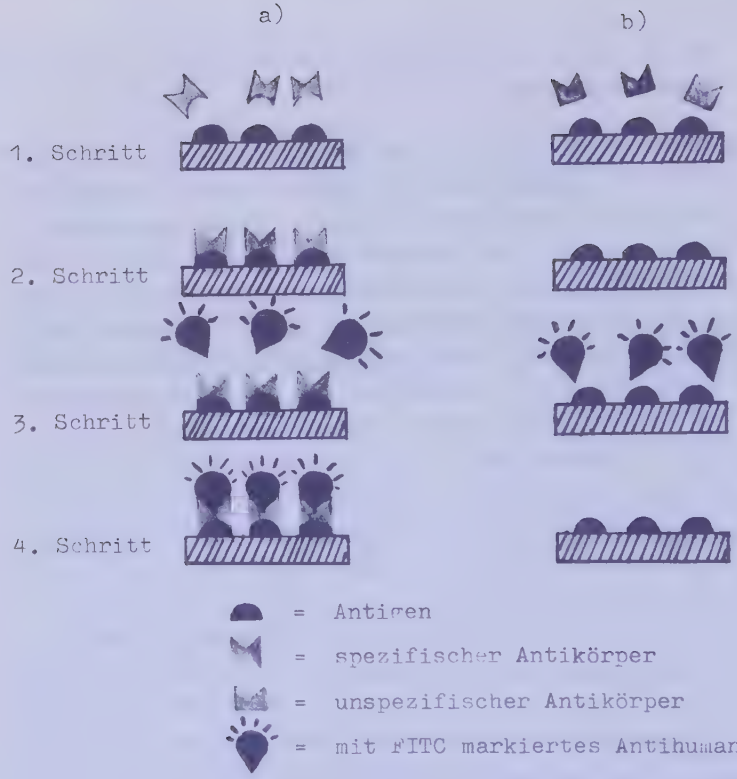


Abbildung 5: Das Prinzip der Sandwichmethode (modifiziert wiedergegeben nach VOGT (1967).

1. Schritt: Bedecken des antigenhaltigen Untersuchungsmaterials (braune Halbkugeln) a) spezifischem Antiserum (Pat.-Serum) b) unspezif. Serum (neg. Kontrolle).

2. Schritt: Während sich die nicht gebundenen unspez. Antikörper in b) durch Waschen entfernen lassen, bleiben die spezif. Antikörper in a) haften.

3. Schritt: Bedecken des Untersuchungsmaterials mit FITC-markiertem Antihumanglobulin.

4. Schritt: Durch erneutes Waschen ist das FITC-markierte Antihumanglobulin in b) wieder entfernt worden.
In a) hingegen blieb es durch die Bindung an die spez. Antikörper haften und ergibt dort eine Fluoreszenz.

b) Das Mikroskop

Zur Beurteilung der Fluoreszenz bedienten wir uns der Dunkelfeldmikroskopie. Die fluoreszierenden Teilchen erscheinen hierbei auf dunklem Untergrund, was bei der Untersuchung kleiner Objekte, wie der Bakterien, besonders vorteilhaft ist.

Jeder Fluoreszenzfarbstoff hat eine charakteristische spektrale Absorptions- oder Anregungskurve und ein charakteristisches Emissionsspektrum.

Das Absorptionsmaximum für FITC liegt bei 44o nm (HOENDERS 1967). Zur Filterung des Quecksilberdampflichtes (Erregerfilter) verwendeten wir daher das Blaufilter 5 mm BG 12, dessen Durchlässigkeitsmaximum etwa zwischen 36o und 46o mm liegt. Wichtig ist vor allem, dass im anregenden Licht kein Licht des wahrnehmbaren emittierten Spektrums enthalten ist.

Das Emissionsspektrum von FITC liegt bei 53o nm, weswegen wir hinter dem Objekt (bzw. vor dem Okular) das Okularsperrfilter K 53o einsetzten, das bei der Wellenlänge 53o nm eine Reintransmission von 5o % aufweist.

Die Präparate wurden mit Immersionsdunkelfeldkondensor und mit dem Spezialfluoreszenzobjektiv Fl 4o/o,85 betrachtet. Da dieses Objektiv ein UV-sperrendes Deckglas vorgefaßt hat, können die Präparate ohne Deckgläser beurteilt werden.

Die Präparate wurden zunächst mit Glühlampenlicht scharf eingestellt. Durch einen einfachen Hebelzug wurde das Glühlampenlicht dann ausgeblendet und das UV-Erregerlicht in den Strahlengang gebracht. Durch Zurückschalten auf Glühlampenlicht konnte man sich je-

derzeit von der Anwesenheit der Bakterien überzeugen, falls die Fluoreszenz nachliess oder ausblieb.

c) Beschreibung der eigenen Methodik

Zur Antigenherstellung wurden 2 mit Reinkulturen beimpfte Blutagarplatten mit je 3 ml physiologischer NaCl-Lösung abgeschwemmt. Diese Bakteriensuspension wurde nun soweit verdünnt, bis bei mikroskopischer Prüfung die Bakterien als Einzelindividuen erkennbar waren. Von dieser verdünnten Suspension wurden dann 1o Arbeitsportionen zu je o,2 ml hergestellt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -2o°C in der Kühltruhe aufbewahrt.

Für die Titerbestimmung im Serum wendeten wir die sogenannte indirekte Sandwichmethode nach COONS und Mitarb. (1958) in der Modifikation nach GREGORCZYK (1966) an. Durch Verwendung von Verdünnungsreihen der zuvor inaktivierten (3o min bei 56°C im Wasserbad) Patientenseren weiteten wir die Methode zu einer semiquantitativen Antikörperbestimmung aus.

Im einzelnen gingen wir folgendermassen vor:

o,o2 ml der Bakteriensuspension wurden auf Spezialobjektträger mit eingeschliffenem Kreis gebracht, und, nachdem wir uns durch ein Testpräparat davon überzeugt hatten, dass die Bakterien als Einzelindividuen erkennbar waren, an der Luft getrocknet und 1o min in Aceton fixiert. Die fixierten Bakterien wurden nun mit o,o3 ml der einzelnen Patientenserumverdünnungen (von 1:2 bis 1:1o24) vorsichtig überschichtet und (zur besseren Anlagerung der Serumantikörper an die antigenen Moleküle auf den Bakterienzellmembranen) in einer feuchten Kammer auf einen Horizontalrotatierer (3o min bei 1oo U/min)

gelegt. Nicht homologe Immunglobuline wurden anschließend durch dreimaliges Waschen (zweimal in Hämagglutinationsphosphatpuffer, einmal in aqua dest, je 1o min lang auf dem Horizontalrotatierer) wieder entfernt. Zur Sichtbarmachung der Ag-Ak-Komplexe im Fluoreszenzmikroskop wurden diese nunmehr mit o,o3 ml der mit FITC-markierten Antihumanglobulinverdünnung (1:4o) beschichtet. Nach erneuter Inkubation und Waschung (wie angegeben) zur Entfernung überschüssigen Antihumanglobulins, erfolgte die Beurteilung der Fluoreszenz im Fluoreszenzmikroskop.

Folgende Kontrollen wurden mit angesetzt:

1) Ersatz des Patientenserums durch physiologische Natriumchlorid-Lösung.
2) Ersatz des Patientenserums durch Salmonellen-Antiserum.
3) Keine Beschichtung mit FITC-markiertem Antihumanglobulin.

Die Beurteilung der Fluoreszenz

Die meist vorhandene, aber schwache Fluoreszenz der negativen Kontrollen wurde als unspezifisch angesehen und als Hintergrundfluoreszenz bezeichnet.

Stärkere Fluoreszenz im Hauptversuch wurde als spezifisch angesehen und je nach ihrer Intensität mit + bis ++++ bewertet.

Als Endtiter wurde die Patientenserumverdünnung angegeben, bei der noch eine deutliche spezifische Fluoreszenz (++) zu sehen war.

Vorversuche:

Zu unserer Übung, zur Prüfung der Methode und zur Schulung des Auges setzten wir zwei Vorversuche an.

Einmal nahmen wir die in der Routine zur Röhrchenagglutination verwendete Proteus OX 19 Bakteriensuspension und das zugehörige Antiserum und verarbeiteten, wie oben beschrieben. Das Serum wurde bis 1:2oo verdünnt. Die Fluoreszenz bei dieser Verdünnung war +++.

Den zweiten Vorversuch stellten wir mit einem durch Züchtung und Objektträgeragglutination identifizierten Dyspepsie-Coli o:78 und dessen Antiserum an. Bei der Verdünnung 1:2oo war die Fluoreszenz noch viermal positiv.

5. Die fluoreszenzmikroskopische Bestimmung der Gammaglobulinfraktionen

Die Konzentrationen der Immunglobuline-G (IgG), Immunglobuline-M (IgM) und Immunglobuline-A (IgA) wurden in ihrer Relation zueinander bestimmt, und zwar jeweils bei den Seren, die bei den Ak-Verlaufskontrollen den höchsten Ak-Titer hatten.

Im Prinzip wurde genau so verfahren wie bei der fluoreszenzmikroskopischen Ak-Bestimmung. Unterste Schicht auf dem Objektträger war die Bakteriensuspension, mittlere Schicht das unverdünnte Patientenserum und oberste Schicht FITC-markiertes Anti-IgG, bzw. Anti-IgM oder Anti-IgA, das von den Behringwerken geliefert wurde.

Folgende Kontrollen wurden mit angesetzt:

1) Ersatz des Patientenserums durch physiologische Natriumchlorid-Lösung.
2) Keine Beschichtung mit FITC-markiertem Anti-humanglobulin.

Unterschiede in der Intensität der Fluoreszenz wurden wiedergegeben durch ein bis vier Kreuze:

\+ = schwache Fluoreszenz, d.h. die betreffende Gammaglobulinfraktion ist nur schwach vertreten.

++++ = starke Fluoreszenz, d.h. die betreffende Gammaglobulininfraktion ist am stärksten vertreten.

6. Die Komplementbestimmung

Die Titration des Gesamtkomplements wurde nach der Standardmethode von MAYER (1961) mit einigen Modifikationen durchgeführt. Es kamen dabei 3,5 x 10^6 Erythrozyten pro ml zur Anwendung. Die Erythrozytenzahl wurde photometrisch nach Zusatz von Transformationslösung nach BETKE und SAVELSBERG (1950) bestimmt, nachdem man vorher die Relation zwischen Höhe der Extinktion und Erythrozytenzahl festgestellt hatte. Die Erythrozytenzahl war dabei im "Sanborn Frommer Cell Counter" ermittelt worden. Die Erythrozyten wurden mit vier Ambozeptoreinheiten sensibilisiert. Der Reaktionsansatz wurde 60 min bei 37°C unter ständigem Schütteln im Wasserbad inkubiert, danach zentrifugiert und 1 ml des Hämolysats in den einzelnen Reagenzröhrchen mit jeweils 1 ml Transformationslösung zu Cyanhämoglobin verwandelt.

Die Extinktion des Cyanhämoglobin wurde im selbständig registrierenden Spektralphotometer "Beckmann DU" in einem Wellenlängenbereich von 600 - 500 nm bestimmt. In diesem Bereich zeigt sich ein Maximum der Extinktion bei 520 nm. Die Auswertung zur Ermittlung der 50 % Hämolyse erzeugenden Komplementeinheit erfolgte graphisch

unter Anwendung der v. Kroghschen Gleichung $x = K(\frac{y}{1-y})^{1/n}$
im doppelten logarithmischen System. Die Steigerung
der Geraden betrug bei allen untersuchten Seren o,25(-1/n

IV. Ergebnisse eigener Untersuchungen.

1. Die gefundenen Keime, ihre Häufigkeit und Verteilung

Die Anzahl der gefundenen Keime ist in Tabelle 4 und Abbildung 6 dargestellt.

Tabelle 4: Verteilung der Keime

Kein Wachstum	bei	6 Pat.	= 4,8 %
1 Keim	bei	55 Pat.	= 44,1 %
2 Keime	bei	45 Pat.	= 35,4 %
3 Keime	bei	16 Pat.	= 12,6 %
4 Keime	bei	4 Pat.	= 3,1 %

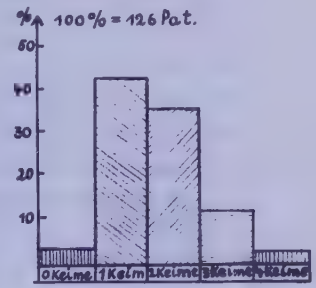


Abbildung 6:
Verteilung der Keime

Die gefundenen Keimarten und die Häufigkeit ihres Vorkommens sind aus Tabelle 5 ersichtlich.

Tabelle 5 gibt an, welche Keimarten gefunden wurden. Ferner, wie oft die einzelnen Keime allein, wie oft in Kombination mit anderen Keimen und wie oft sie insgesamt gefunden wurden.

Keimart	als einziger Erreger	in Kombination mit anderen Keimen	Vorkommen insgesamt	% d.Pat.
Strept.virid.	11	62	73	57,1
Neisseriaceae	15	36	51	4o,4
Haemoph.infl.	8	7	15	11,9
neg.Stäbchen	5	8	13	1o,3
Hefen	-	1o	1o	7,9
Pseudomonas	2	6	8	6,3
Dipl.pneumon.	3	4	7	5,6
Staph.albus	1	6	7	5,6
Proteus	3	4	7	5,6
Klebsiella	1	6	7	5,6
E. coli	1	5	6	4,8
Staph.aureus	2	4	6	4,8
Cloaca	1	3	4	3,2
Enterokokken	-	3	3	2,4
Achromobacter	1	-	1	o,8
Keim der Coli-gruppe	1	-	1	o,8

2. Ergebnisse der Titerbestimmungen mit Hilfe der indirekten Hämagglutination

Die Antikörpertiter bei den 93 Einmalkontrollen mit Hilfe der indirekten Hämagglutination sind aus Tabelle 6 ersichtlich.

Tabelle 6: Höhe der durch die indirekte Hämagglutination ermittelten Antikörpertiter bei 93 Patienten.

Keimart	Reziproke Werte der Patientenserumverdünnungen (Titer)								
	ø	2	4	8	16	32	64	128	256
Neisseriaceae	21	4	6	1	1				
M.ident.ø Stäb.	9	2	1	1					
Staph.albus	2	1	1						
Staph.aureus	9	1	1						
Proteus		2		1	2	1			
Cloaca			1		1				
Pseudomonas		1		1	2	1			1
Pneumokokken	1	1			1	1	1		
Hämoph.infl.	1	1			1		1		
E.coli		2	1			1		1	
Klebsiella		1	1	1	2		1		1
Enterokokken	2								

Die Zahlen in den Spalten geben an, wie oft gegen die betreffende Keimart der angegebene Titer ermittelt wurde.

Die mitangesetzten Kontrollen (siehe Abschnitt III/2/d) fielen wie folgt aus:

Die Ansätze mit Patientenseren und nicht sensibilisierten Erythrozyten blieben immer ohne jegliche Agglutination.

Die Ansätze mit Pufferlösung und sensibilisierten Erythrozyten zeigten ebenfalls nie eine Agglutination.

Die Ansätze mit Seren gesunder Personen und sensibilisierten Erythrozyten zeigten ebenfalls in der Mehrzahl der Fälle keine Agglutination. In einigen Fällen war jedoch auch bei mäßigen Verdünnungsgraden noch eine Agglutination erkennbar. Jedoch nur in 2 Fällen wurde bei einer Serumverdünnung von mehr als 1:4 eine Agglutination registriert. Näheres ist aus Tabelle 7 ersichtlich.

Tabelle 7: Höhe der Kontrolltiter, wie sie beim Ansetzen von Serum gesunder Personen mit sensibilisierten Erythrozyten erhalten wurden.

Titer	Reziproke Werte der Patientenserumverdünnungen				
	ø	2	4	8	16
Zahl der Kontrollen	155	23	6	1	1
%	84	12	3	0,5	0,5

Die Ergebnisse dieser Kontrollen erlauben es uns, bereits bei einem Titer von 8 auf das Vorhandensein spezifischer Antikörper zu schliessen. Agglutination bei einer Serumverdünnung von 1:4 mag zwar auch in den meisten Fällen auf spezifische Antikörper zurückzuführen sein, jedoch kann es im Einzelfall nicht mit Sicherheit behauptet werden, da immerhin auch ca. 3 % der negativen Kontrollen bei dieser Verdünnung noch eine Agglutination zeigten.

[illegible]. Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopischen Bestimmung der Antikörper (Vorläufe, Kontrollen) und Immunglobulinfraktionen, sowie die Ergebnisse der Komplementbestimmungen

a) Die Vorversuche

Erster Vorversuch mit Dyspepsie-coli O:78 (aus einem [illegible] Tinssuhl angezüchtet) und seinem spezifischen Antiserum (aus dem Routinelabor).

Um eine Kreuzantigenität mit Salmonellen zum Anti O:[illegible] auszuschließen, wurde eine Objektträgeragglutination durchgeführt. Sie war negativ.

Die Ergebnisse des ersten Vorversuches gibt Tabelle 8 wieder.

Tabelle 8: Ergebnisse des fluoreszenzmikroskopischen AK-Nachweises gegen Dyspepsie-coli O:78 in spezifischem Antiserum, sowie die Ergebnisse der Kontrollen.

Serum-verd.	Ergebnis	Negativ-Kontrollen	Ergebnis
unverd.	++++	Keim + NaCl + Konj.	Hintergrund-fluoreszenz
1:[illegible]	++++		
1:[illegible]	+++	Keim + Sal.-Anti-[illegible] + Konj.	Hintergrund-fluoreszenz
1:[illegible]	++		

Zweiter Vorversuch mit Proteus OX 1[illegible] und seinem spezifischen Antiserum x). Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: Ergebnisse des fluoreszenzmikroskopischen AK-Nachweises gegen Proteus OX 1[illegible] in spezifischem Antiserum, sowie die Kontrollen

Serum-verd.	Ergebnis	Negativ-Kontrollen	Ergebnis
unverd.	++++	Keim + NaCl + Konj.	Eigenfluo-reszenz +
1:5	++++		
1:[illegible]	+++	Keim + [illegible].-Anti-[illegible] + Konj.	[illegible] - [illegible] +
1:[illegible]	++		
1:[illegible]	+ +		

x) Sowohl die Bakteriensuspension als auch das Antiserum wurden von den Behringwerken geliefert.

b) Die Hauptversuche

An 8 Patienten wurden Verlaufskontrollen der Antikörper(AK)- und Komplement(C′)-Titer vorgenommen, sowie die Immunglobulinfraktionen bestimmt.

1. Patient: R.E. Diagnose: Chron. Emphysembronchitis
Keime : 1. Pseudomonas aeruginosa
2. Cloaca

Tabelle 10: Ergebnisse der AK-Titerbestimmung gegen Pseudomonas aeruginosa, sowie die Kontrollen.

Serum-verdg.	Intensität der Fluoreszenz bei den einzelnen Patientenseren			
	Serum 1	Serum 2	Serum 3	
unverd.	++++	++++	++++	
1:2	++++	++++	++++	
1:4	++++	+++	+++	
1:8	+++	++	++	
1:16	++	+++	++	
1:32	++	+	++	
1:64	+	+	+	
1:128	+	+	+	

Negativ-Kontrollen	Ergebnis
Keim + NaCl + Konjugat :	Hintergrundfluoresz.
Keim+Salm.-Serum anti-O:9+Konj.:	"
Keim + Patientenserum :	"

Tabelle 11: Relativer Anteil der IgG, IgA und IgM an den AK gegen Pseudomonas aeruginosa. Es wurde das Serum der 3. Titerbestimmung unverdünnt verwendet.

Immunglobulinfraktion	Ergebnis	Kontrollen	Ergebnis
Keim+Patientenserum+ markiertes Anti-IgG	++++	Keim+NaCl+ m.Anti-IgG	Hintergrund-fluoreszenz
Keim+Patientenserum+ markiertes Anti-IgA	+	Keim+NaCl+ m.Anti-IgA	Hintergrund-fluoreszenz
Keim+Patientenserum+ markiertes Anti-IgM	++	Keim+NaCl+ m.Anti-IgM	Hintergrund-fluoreszenz
		Keim+Patientenserum	sehr schwache Hintergrund-fluoreszenz

Tabelle 12: Ergebnisse der AK-Titerbestimmung gegen Cloaca, sowei die Kontrollen.

Serum-verd.	Intensität der Fluoreszenz bei den einzelnen Patientenseren			
	Serum 1	Serum 2	Serum 3	
unverd.	++++	++++	++++	
1:2	++++	++++	++++	
1:4	++++	+++	+++	
1:8	++	+++	++	
1:16	++	++	++	
1:32	+	+	+	
1:64	+	+	+	
1:128	+	+	+	

Negativ-Kontrollen	Ergebnis
Keim + NaCl + Konjugat :	Hintergrundfluoresz.
Keim+Salm.-Serum anti-O:9+konj.:	"
Keim + Patientenserum :	"

Tabelle 13: Relativer Anteil der IgG, IgA und IgM an den AK gegen Cloaca, sowei die Kontrollen. Es wurde das Serum der 3. Titerbestimmung undünnt verwendet.

Immunglobulinfraktion	Ergebnis
Keim+Patientenserum+ markiertes Anti-IgG	++++
Keim+Patientenserum + markiertes Anti-IgA	+
Keim+Patientenserum + markiertes Anti-IgM	++

Kontrollen	Ergebnis
Keim+NaCl+ m.Anti-IgG	Hintergrund-fluoreszenz
Keim+NaCl+ m.Anti-IgA	Hintergrund-fluoreszenz
Keim+NaCl+ m.Anti-IgM	Hintergrund-fluoreszenz
Keim+Patienten-serum	keine Fluoreszenz

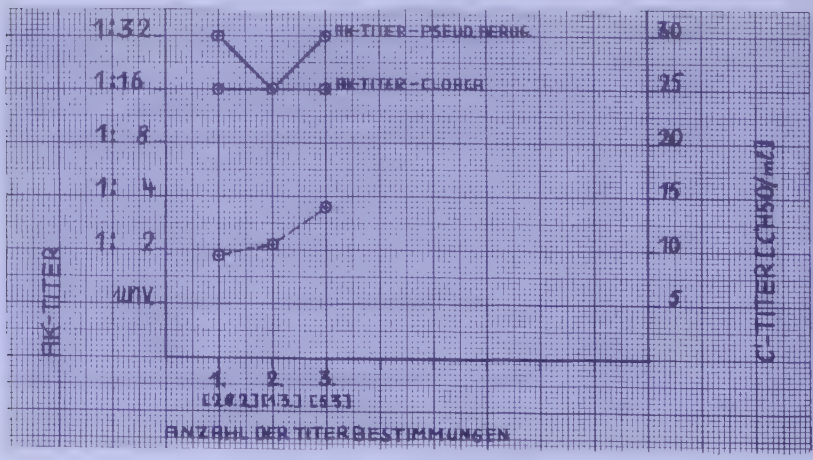


Abbildung 7: Zusammenfassende Darstellung über den Verlauf der AK-Titer ——● und C'-Titer ●----● beim Patienten R.E..

Bild 1: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Cloaca.
Vergrößerung 530-fach.
Antikörperbestimmung mit der indirekten Sandwich-methode (COONS).
Markierungsfarbstoff: Fluoresceinisothiocyanat.
Dunkelfeldanregung mit Immersionsdunkeldeldkondensor.
Objektiv: Spezialfluoreszenzobjektiv Fl 40/085.
Erregerfilter: BG 12/3 mm.
Sperrfilter: K 530.

Die Ausschnittvergrößerung zeigt die stäbchenförmigen Keime, die zum Teil in Agglutination zusammenliegen.
(Der intensiv strahlende Lichtpunkt in der Nähe der Bildmitte ist eine Verunreinigung.)

2. Patient: Sch. Th. Diagnose: Chronische Bronchitis
Keim : Diplok. pneumoniae

Tabelle 14: Ergebnisse der AK-Titerbestimmung gegen Diplokokkus pneumoniae, sowie die Kontrollen.

Serumverd.	Intensität der Fluoreszenz bei den einzelnen Patientenseren					
	Serum 1	Serum 2	Serum 3	Serum 4	Serum 5	
unverd.	++++	++++	++++	++++	++++	
1:2	++++	++++	++++	++++	++++	
1:4	++++	++++	++++	++++	+++	
1:8	++++	++++	+++	+++	+++	
1:16	+++	++++	+++	+++	++	
1:32	++	++++	++	+++	++	
1:64	++	+++	+++	+++	++	
1:128	++	++	++	++	++	
1:256	+	++	++	++	+	
1:512	+	++	+	+	+	
1:1024		+		+		
1:2048		+		+		

Negativ-Kontrollen	Ergebnis
Keim + NaCl + Konjugat :	Hintergrundfluoresz.
Keim+Salm.Antiserum O:9+Konj.:	"
Keim + Patientenserum :	"

Tabelle 15: Relativer Anteil der IgG, IgA und IgM an den AK gegen Dip. pneumoniae. Es wurde das Serum der 4. Titerbestimmung unverdünnt verwendet.

Immunglobulinfraktion	Ergebnis	Kontrollen	Ergebnis
Keim+Patientenserum+ markiertes Anti-IgG	+	Keim+NaCl+ m.Anti-IgG	Hintergrund fluoreszenz
Keim+Patientenserum+ markiertes Anti-IgA	+++	Keim+NaCl+ m.Anti-IgA	Hintergrund fluoreszenz
Keim+Patientenserum+ markiertes Anti-IgM	++++	Keim+NaCl+ m.Anti-IgM	Hintergrund fluoreszenz
		Keim+Patientenserum	keine Fluoreszenz

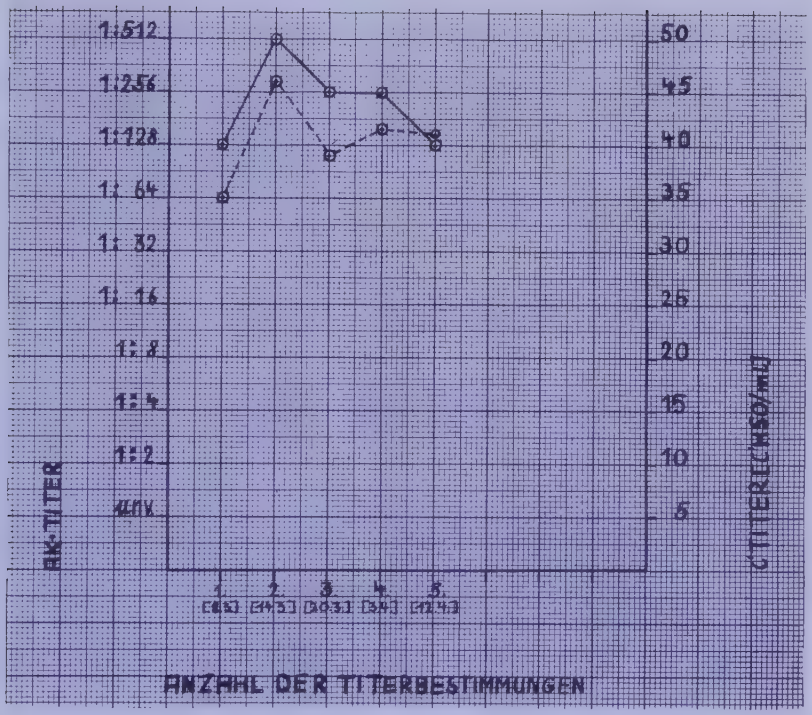


Abbildung 8: Zusammenfassende Darstellung über den Verlauf der AK-Titer ——— und der C'-Titer - - - - beim Pat. Sch. Th..

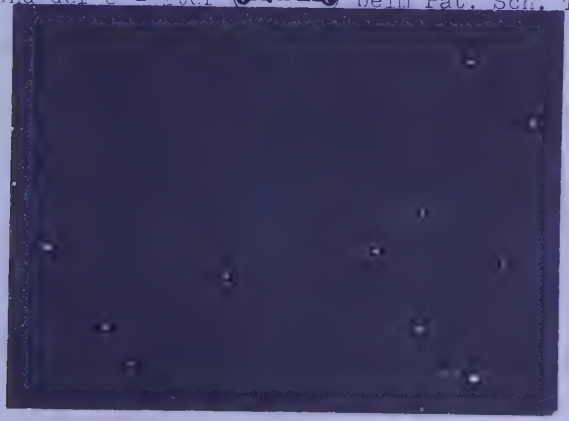


Bild 2: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Diplokokken pneumoniae.
Technische Daten wie bei Bild 1.

3. Patient: B. M. Diagnose: Chron. Bronchitis
Keim : Proteus

Tabelle 16: Ergebnisse der AK-Titerbestimmung gegen Proteus, sowie die Kontrollen.

Serum-verd.	Intensität der Fluoreszenz bei den einzelnen Patientenseren					
	Serum 1	Serum 2	Serum 3	Serum 4	Serum 5	
unverd.	++	++++	+++	+++	++	
1:2	++	++	+++	++	++	
1:4	++	++	+++	+	++	
1:8	+	++	+++	+	++	
1:16	+	++	+++	+	+	
1:32	+	++	+++	+		
1:64	+	++	+++	+		
1:128	+	++	+++	+		
1:256		++	++	+		
1:512		++	++	+		
1:1024		+	++	+		
1:2048		+	+	+		
1:4096		+				

Negativ-Kontrollen	Ergebnis
Keim + NaCl + Konjugat :	Hintergrundfluoresz.
Keim+Salm.Antiserum 1:64+Konj.:	Eigenfluoreszenz +
Keim + Patientenserum :	Eigenfluoreszenz +

Tabelle 17: Relativer Anteil der IgG, IgA und IgM an den AK gegen Proteus. Es wurde das Serum der 2. Titerbestimmung unverdünnt verwendet.

Immunglobulinfraktion	Ergebnis	Kontrollen	Ergebnis
Keim+Patientenserum+ markiertes Anti-IgG	+++	Keim+NaCl+ m.Anti-IgG	Hintergrund-fluoreszenz
Keim+Patientenserum+ markiertes Anti-IgA	++	Keim+NaCl+ m.Anti-IgA	Hintergrund-fluoreszenz
Keim+Patientenserum+ markiertes Anti-IgM	+	Keim+NaCl+ m.Anti-IgM	Hintergrund-fluoreszenz
		Keim+Patientenserum	keine Fluoreszenz

Abbildung 2: Zusammenfassende Darstellung über den Verlauf der Ak-Titer (●——●) und der C'-Titer (●- - - -●) beim Pat. B.M..

Bild 3: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Proteus. Technische Daten siehe Bild 1.

4. Patient: B. N. Diagnose: Chronische Bronchitis
Keim : Hämophilus influenzae

Tabelle 18: Ergebnisse der AK-Titerbestimmung gegen H. influenzae, sowie die Kontrollen.

Serum-verdg.	Intensität der Fluoreszenz bei den einzelnen Patientenseren			
	Serum 1	Serum 2	Serum 3	
unverd.	++++	++++	+++	
1:2	+++	++++	+++	
1:4	+++	++++	+++	
1:8	++	++	++	
1:16	++	+	++	
1:32	++	+	+	
1:64	++	+		
1:128	+	+		
1:256	+	+		
1:512	+	+		

Negativ-Kontrollen	Ergebnis
Keim + NaCl + Konjugat :	Hintergrundfluoresz.
Keim+Salm.Antiserum 1:8+Konj. :	"
Keim + Patientenserum :	"

Tabelle 19: Relativer Anteil der IgG, IgA, und IgM an den AK gegen H. influenzae. Es wurde das Serum der 1. Titerbestimmung unverdünnt verwendet.

Immunglobulin	Keim	Ergebnis	Kontrollen	Ergebnis
Keim+Patientenserum+ markiertes Anti-IgG		+++	Keim+NaCl+ m.Anti-IgG	Hintergrund-fluoreszenz
Keim+Patientenserum+ markiertes Anti-IgA		++++	Keim+NaCl+ m.Anti-IgA	Hintergrund-fluoreszenz
Keim+Patientenserum+ markiertes Anti-IgM		+	Keim+NaCl+ m.Anti-IgM	Hintergrund-fluoreszenz
			Keim+Patienten-serum	keine Fluoreszenz

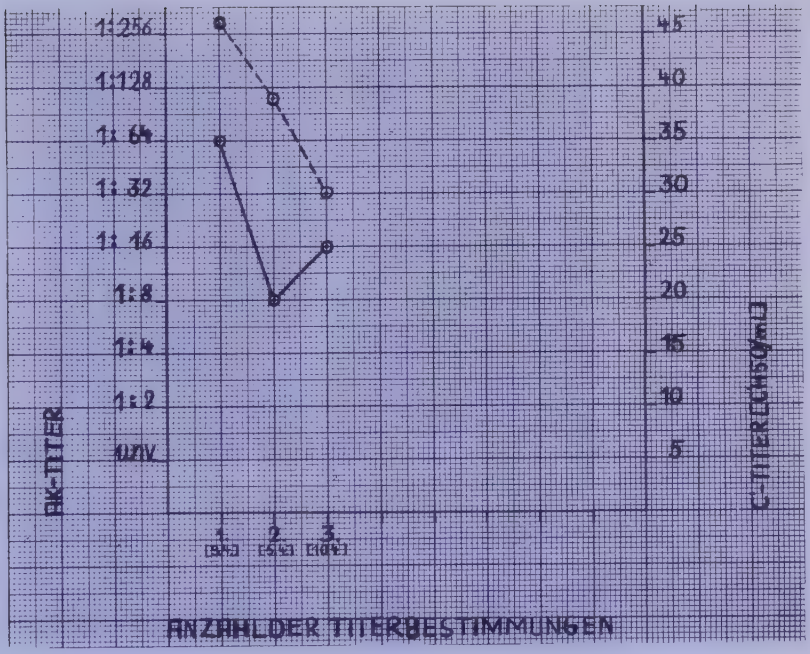


Abbildung 10: Zusammenfassende Darstellung über den Verlauf der AK-Titer (●——●) und der C'-Titer (●- - -●) beim Pat. B. N..

Bild 4: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Hämophilus influenzae. Technische Daten siehe Bild 1.

5. Patient: S. O. Diagnose: Asthmabronchitis

Keim : Keim der Coligruppe

Tabelle 20: Ergebnisse der AK-Titerbestimmung gegen einen Keim der Coligruppe, sowie die Kontrollen.

Serum-verd.	Intensität der Fluoreszenz bei den einzelnen Patientenseren					
	Serum 1	Serum 2	Serum 3	Serum 4	Serum 5	Serum 6
unverd.	++++	++++	++++	++++	++++	++++
1:2	+++	+++	+++	+++	+++	+++
1:4	+++	++	++	++	+++	++
1:8	++	++	++	++	++	+
1:16	+	+	+	+	+	+
1:32	+	+	+	+	+	+

Negativ-Kontrollen	Ergebnis
Keim + NaCl + Konjugat	schwache hintere Ringfl.
Keim + Serum-Antigen + Konjugat	schwache hintere Ringfl.
Keim + Patientenserum	starke Hintere Ringfl.

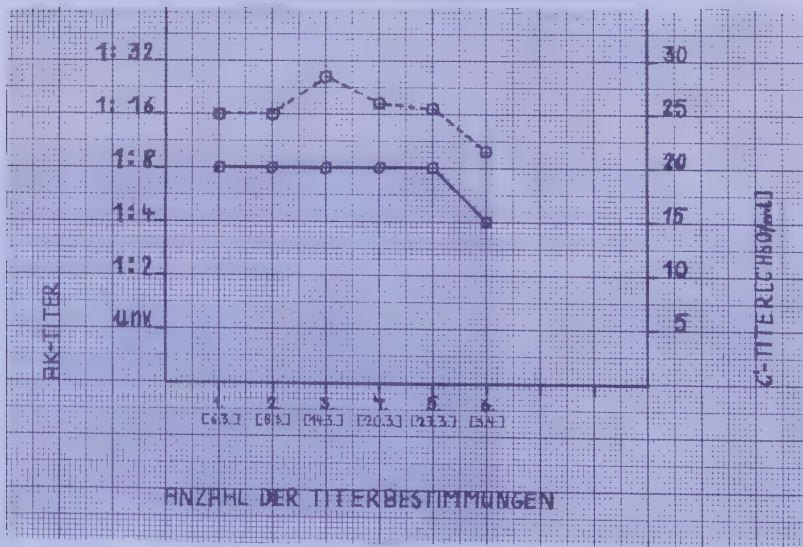


Abbildung 11: Zusammenfassende Darstellung über den Verlauf der AK-Titer ——● und Z-Titer ●----●

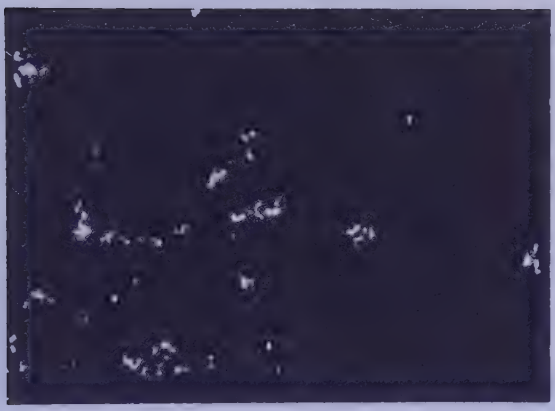


Bild 5: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Keimes der Coligruppe.
Die Bakterien liegen größtenteils in Agglutinaten zusammen. In der rechten oberen Bildecke ist ein einzelnes Stäbchen zu erkennen.

6. Patient: [illegible] Diagnose: [illegible] Bronchitis

Keim : Haemoph. influenzae

Tabelle 21: [illegible] der [illegible]-[illegible] [illegible], sowie die Kontrollen

Serum-verd.	Intensit[illegible] der [illegible] bei den ein[illegible]		
	Serum 1	Ser[illegible]	
unverd.	+++	++++	
1:2	+	++	
1:4	+	+	
1:	+	+	
1:1[illegible]	+	+	
1:[illegible]	+	+	

[illegible]tiv-Kontrolle	Ergebnis
[illegible] + [illegible] + [illegible]	[illegible]inter [illegible]
[illegible] + Sal[illegible] [illegible]	[illegible]
[illegible] + [illegible]	[illegible]nter [illegible]

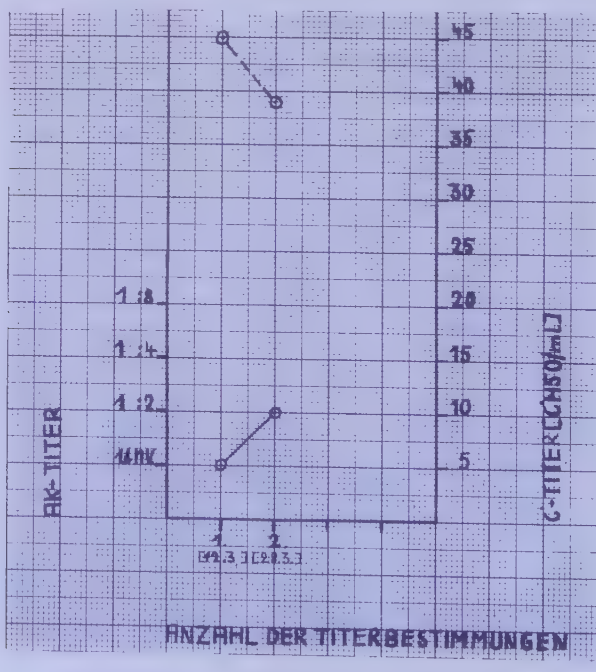


Abbildung 1[illegible]: Verla[illegible] [illegible] (o——o) [illegible] (o- - - -o).

7. Patient: B. K. Diagnose: Asthma bronchiale, Emphysem chronische Bronchitis

Keim : Cloaca

Tabelle 22: Ergebnisse der AK-Titerbestimmung gegen Cloaca, sowie die Kontrollen.

Serum-verdg.	Intensität der Fluoreszenz bei den einzelnen Patientenseren							
	Serum 1	Serum 2	Serum 3	Serum 4	Serum 5	Serum 6	Serum 7	Serum 8
unverd.	++++	+++	+++	++++	++++	++++	++++	++++
1:2	+++	++	++	+++	++	+++	+++	+++
1:4	+	+	++	++	++	+++	+++	++
1:8	+	+	+	+	+	+	+	+
1:16	+							
1:32	+							
1:64	+							
1:128	+							

Negativ-Kontrollen	Ergebnis
Keim + NaCl + Konjugat	schwache Hintergrundfluoresz.
Keim+Salm.-Antiserum O:9 + Konjugat	schwache Hintergrundfluoresz.
Keim + Patientenserum	schwache Hintergrundfluoresz.

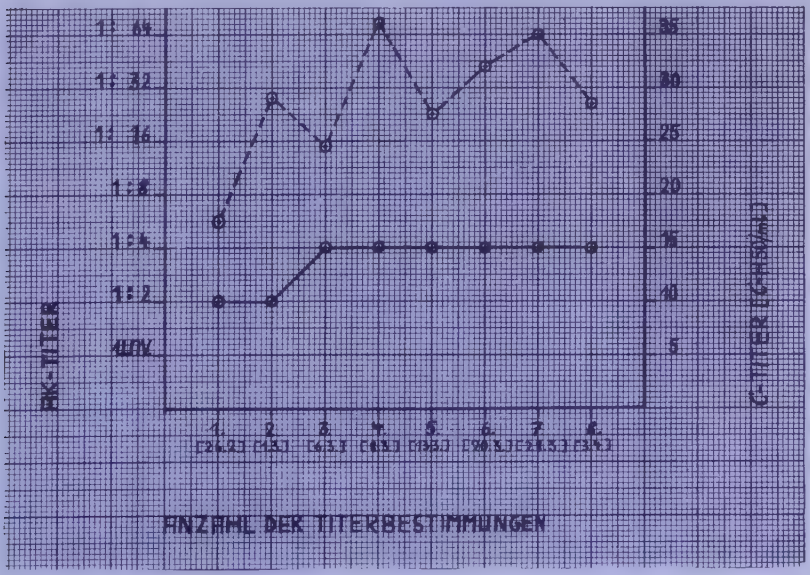


Abbildung 12: Verlauf der C'-Titer (o-----o) und AK-Titer (o——o).

6. Patient: M. F. Diagnose: Chronische Bronchitis

Keim : Achromobacter

Tabelle 25: Ergebnisse der AK-Titerbestimmung gegen Achromobacter, sowie die Kontrollen.

Serum-verd.	Intensität der Fluoreszenz bei den einzelnen Patientenseren							
	Serum 1	Serum 2	Serum 3	Serum 4	Serum 5	Serum 6	Serum 7	
unverd.	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	
1:2	+++	+++	+++	+++	++	++	++	
1:4	++	+++	+++	++	++	++	++	
1:8	++	+++	++	++	++	++	++	
1:16	++	++	+	+	+	+−	++	
1:32	+	++	+	+	+	+	+	
1:64	+	++	+	+	+	+	+	
1:128	+	+	+	−	+	+	+	

Positiv-Kontrollen	Ergebnis
[illegible]	Hintergrundfloresz.
[illegible]	Hintergrundfloresz.
[illegible] unverd.	Hintergrundfloresz.

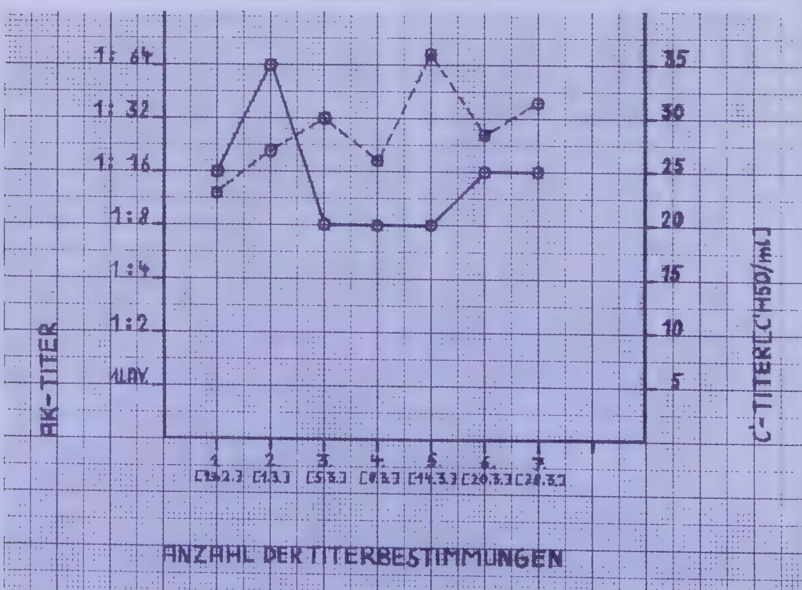


Abbildung 14: Verlauf der AK-Titer (o———o) und C'-Titer (o- - - -o).

4. Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopischen Einmalbestimmungen der Antikörper

Zur Untersuchung gelangten 5 Patienten. Die Ergebnisse sind in den folgenden Tabellen 24-28 wiedergegeben.

1. Patient: F. G. Diagnose: Chronische Bronchitis
Keim : Hämophilus influenzae

Tabelle 24: Ergebnis der AK-Titerbestimmung gegen H. influenzae, sowie die Kontrollen.

Serum-verdg.	Intensität der Fluoreszenz	Negativ-Kontrollen	Ergebnis
unverd.	++++	Keim + NaCl + Konjugat	Hintergrund-fluoreszenz
1:2	+++		
1:4	++++	Keim+Salm.-Antiserum O:9 + Konjugat	Hintergrund-fluoreszenz
1:8	+++		
1:16	+++		
1:32	++	Keim + Patientenserum	Hintergrund-fluoreszenz
1:64	+		

2. Patient: M. H. Diagnose: Chronische Bronchitis
Keim : Hämophilus influenzae

Tabelle 25: Ergebnis der AK-Titerbestimmung gegen H. influenzae, sowie die Kontrollen.

Serum-verdg.	Intensität d. Fluoreszenz	Negativ-Kontrollen	Ergebnis
unverd.	+++	Keim + NaCl + Konjugat	schwache Hintergrundfluor.
1:2	++++		
1:4	++++	Keim+Salm.-Antiserum O:9 + Konjugat	schwache Hintergrundfluor.
1:8	+++		
1:16	++		
1:32	++	Keim + Patientenserum	schwache Hintergrundfluor.
1:64	+		
1:128	+		
1:256	+		

3. Patient: W. J. Diagnose: Chronische Bronchitis

Keim : Proteus

Tabelle 26: Ergebnis der AK-Titerbestimmung gegen Proteus, sowie die Kontrollen.

Serum-Verd.	Intensität d. Fluoreszenz	Negativ-Kontrollen	Ergebnis
unverd.	++++	Keim + Kon.	Hintergrund-fluoreszenz
1:2	++++	+ Konjugat	
1:4	++	Keim+Serum-Ansatz:	Hintergrund-fluoreszenz
1:	++	+ Konjugat	
1:16	++	Keim + Bakterien-Ansatz	Hintergrund-fluoreszenz
1:32	++		
1:64	+		

4. Patient: I. C. Diagnose: Chronische Bronchitis

Keim : St. aureus

Tabelle 27: Ergebnis der AK-Titerbestimmung gegen St. aureus, sowie die Kontrollen.

Serum-Verd.	Intensität d. Fluoreszenz	Negativ-Kontrollen	Ergebnis
unverd.	+++	Keim + Kon.	Hintergrund-fluoreszenz
1:2	+++	+ Konjugat	
1:	+++	Keim+Serum-Ansatz:	Hintergrund-fluoreszenz
1:	++	+ Konjugat	
1:1	++	Keim + Bakterien-Ansatz	Hintergrund-fluoreszenz
1: 2	+		

5. Patient: E. K. Diagnose: Chronische Bronchitis

Keim : Staph. aureus

Tabelle 28: Ergebnis der AK-Titerbestimmung gegen Staph. aureus, sowie die Kontrollen.

Serum-Verd.	Intensität d. Fluoreszenz	Negativ-Kontrollen	Ergebnis
unverd.	++++	Keim + Kon.	schwache Hintergrundfluoreszenz
1:2	+++	+ Konjugat	
1:4	++	Keim+Serum-Ansatz:	schwache Hintergrundfluoreszenz
1:	++	+ Konjugat	
1:1	++	Keim + Bakterien-Ansatz	schwache Hintergrundfluoreszenz
1:2	+		

V. Diskussion der Ergebnisse und Schlussfolgerungen

1. Häufigkeit bakterieller Bronchialsekrete

Die Häufigkeit, mit der bei unspezifischen Erkrankungen der Luftwege das Bronchialsekret bakterielle Erreger enthält, ist sehr von dem klinischen Krankheitsbild abhängig. SCHERRER (1958) fand bei Patienten mit chronischer Asthmabronchitis o h n e Cor pulmonale nur in 53 % der Fälle bakterielle Erreger im Bronchialsekret, bei Patienten m i t Cor pulmonale hingegen in 8o % der Fälle. BUCHER (1965) fand bei chronischen Bronchitikern o h n e Emphysem in 55 % der Fälle Bakterien im Bronchialsekret. Bei Patienten m i t Emphysem hingegen waren es 67 %, und mit Bronchiektasen 85 % der Fälle, bei denen Erreger aus dem ausgewaschenen Sputum isoliert werden konnten.

Bei unserem Patientengut fanden sich nur bei 4,8 % überhaupt keine Bakterien im Sputum. Dieser niedere Prozentsatz an abakteriellen Bronchialsekreten mag einerseits daher kommen, weil wir vielfach erst dann einen Patienten in unsere Untersuchung einbezogen, wenn vorher im 'Routinebetrieb' des Instituts für Hygiene und Mikrobiologie bereits Erreger im gewaschenen Sputum ermittelt worden waren, andererseits daher, weil wir für die speziellen Untersuchungen nur Patienten mit eindeutiger klinischer Symptomatik wählten.

2. Erregerkombinationen

BUCHER (1965) fand bei 46 % von 454 bakterienhaltigen Bronchialsekreten einen einzigen Erreger, bei 37 % zwei, bei 15 % drei und bei 2 % vier und mehr Erreger.

Diese Ergebnisse stimmen ziemlich genau mit unseren in Tabelle 4 wiedergegebenen Befunden überein.

Hämophilus influenzae, Pneumokokken und Proteus fanden wir häufiger als die anderen Keime als einzige Erreger.

In 21 Fällen wurde die Kombination Streptokokkus viridans und Neisseria catarrhalis gefunden, wobei zu erwähnen ist, dass sowohl bei dieser Kombination, als auch in den Fällen, in denen Streptokokken und Neisserien als einzige Erreger gefunden wurden, die Beschaffenheit des Sputums oft nur schleimig (79 % dieser Fälle) und dünnflüssig (71 % dieser Fälle) war.

Ein Sputum mit eitrigem Aussehen und zäher Konsistenz kam bei dieser Erregerkombination nur einmal vor, im Gegensatz zu allen übrigen Sputen, bei denen diese Beschaffenheit in 59 % dieser Fälle notiert wurde.

Weitere typische Erregerkombinationen wurden ebensowenig mit statistisch signifikanter Häufigkeit festgestellt, wie das Auftreten bestimmter Erreger oder Erregerkombinationen bei bestimmter Beschaffenheit der Sputen.

3. Die einzelnen Erreger

a) Hämophilus influenzae

Autorenangaben über das Vorkommen von Hämophilus influenzae im Bronchialsekret chronischer Bronchitiker schwanken zwischen 3 % (HOWELL 1951) und 76 % (BAUMFITT u. Mitarb. 1957). Das durchschnittliche Vorkommen, errechnet aus den Befunden 10 verschiedener Autoren (s.Tab. 3), liegt bei 33,5 %. Wir fanden Hämophilus influenzae nur bei 11,9 % der Fälle.

Bei allen Autoren herrscht Einigkeit darüber, dass dem Hämophilus influenzae in der Unterhaltung chronisch-bronchitischer Infektionen eine erhebliche Bedeutung zukommt. ELMES u. Mitarb. (1959), MAY (1953), FOX u. Mitarb. (1957) und BUCHER (1965) begründen dies in erster Linie damit, dass einerseits nach Gabe von Antibiotika der Hämophilus influenzae aus dem Bronchialsekret verschwindet, und andererseits eine deutliche Besserung des klinischen Bildes beobachtet wird. Unklar ist jedoch noch die Art und Weise der pathogenen Wirksamkeit. HERS u. MULDER (1953) fanden bei histologischen Untersuchungen hämophile Stäbchen unter dem Epithel, ja sogar unter der Basalmembran der Bronchialschleimhaut. Sie folgerten daraus, dass der Erreger in der Lage sei, auch ohne Vorschädigung des Epithels (Virusinfektion) in die Schleimhaut einzudringen. GLYNN u. MICHAELS (1960) konnten jedoch in eigenen Versuchen diesen Befund nicht bestätigen: Sie fanden den Hämophilus influenzae nicht im histologischen Präparat.

REID (1960) weist aber darauf hin, dass auch bei alleiniger Vermehrung auf der Schleimhautoberfläche ein Keim insofern pathogen sei, als er durch Reizung der bronchialen Drüsen eine Hypersekretion hervorruft. (wie bereits beschrieben, ist es ja gerade die Hypersekretion, zusammen mit einem gestörten Abtransport des Schleimes aus den Bronchien, die den ganzen pathogenetischen Mechanismus in Gang bringen und unterhalten.)

Auch MILLER (1961) betont, dass der Hämophilus influenzae in der Regel nicht invasiv sei, sondern sich im retinierten Sekret der Bronchien vermehre und dadurch entzündliche Reaktionen hervorrufe.

Hämophilus influenzae tritt als kapselhaltige (S-Form) und als kapsellose (R-Form) auf.

Die kapselhaltige Form ist meist für Meningitis (BUCHER 1965) verantwortlich, sowie für Pneumonien (WILSON u. Mitarb. 1924) und Bronchopneumonien (HUMPHREY u. Mitarb. 1946). Auch die akute Bronchiolitis bei Kleinkindern wird vorwiegend von der kapselhaltigen Form verursacht. So konnten WOOD u. Mitarb. (1954) bei 46 von 51 Kindern mit akuter Bronchiolitis spezifische Serumantikörper nachweisen, ohne jedoch einen Bezug herstellen zu können, zwischen der Schwere des Krankheitsbildes und der Titerhöhe.

Eigenartigerweise wird die kapselhaltige Form von Hämophilus influenzae bei der chronischen Bronchitis nur ganz selten angetroffen. 95 - 99 % (MULDER 1961) der hier gefundenen Influenzaekeime gehören der kapsellosen Form an, die nicht typisierbar ist und gegen die auch keine spezifischen Antikörper zu erwarten sind. Wenn GLYNN (1959) dennoch so relativ hohe Antikörpertiter gegen Hämophilus influenzae bei der chronischen Bronchitis fand (s.Tab. 1), dann ist das wohl auf die grosse Antigenheterogenität der kapsellosen Form zurückzuführen, die WILSON u. Mitarb. (1955) bereits 1955 entdeckt hatten. Da GLYNN die Antigenheterogenität bekannt war, konnte er auch darauf verzichten, die Patientenseren nur gegen patienteneigene Stämme zu testen. Er machte daher, ebenso wie MAY (1965), seine Antigenaufschwemmung mit einem beliebigen (aus bronchialsekret gewonnenen) Stamm und testete damit alle Patientenseren.

Dass GLYNN soviel höhere Titer fand als wir, mag wohl auf die gänzlich verschiedenartige Methode der Antigenbereitung zurückzuführen sein. Vergleichende Rück-

schlüsse auf die Antikörpermenge darf man sicherlich nicht ziehen bei Ergebnissen, die mit unterschiedlichen Methoden gewonnen wurden. Bei einer ausreichend signifikanten Abhebung gegenüber den gewissenhaft durchgeführten negativen Kontrollen ist in beiden Fällen vorerst nur die Aussage möglich, dass Antikörper vorhanden sind. Quantitative Vergleiche sind nur innerhalb der mit genau den gleichen Methoden erhaltenen Ergebnissen erlaubt.

Von den 8 von uns untersuchten Patienten hatten 5 einen Titer, der eindeutig auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen Hämophilus influenzae hinweist. Bei an 2 Patienten vorgenommenen Verlaufskontrollen wurden nur mässige Titerschwankungen festgestellt.

Wenngleich wir also Hämophilus influenzae im Vergleich zu den meisten anderen Autoren weniger oft bei Patienten fanden, weisen die gefundenen Antikörper doch darauf hin, dass der Keim in vielen Fällen an der Aufrechterhaltung der chronisch-bronchitischen Infektion zumindest mitbeteiligt ist. Ob jedoch wegen des Vorhandenseins von Antikörpern die Frage der invasiven Eigenschaften des Hämophilus influenzae eindeutig mit ja beantwortet werden kann, wie MURDOCH u. Mitarb.(1959) dies aufgrund der Befunde von GLYNN taten, können wir nicht entscheiden.

b) D. pneumoniae

Die Angaben über das Vorkommen von Pneumokokken sind auch sehr unterschiedlich bei den einzelnen Autoren. FINDEISEN u. Mitarb. (1962) fanden Pneumokokken nur bei 4 % ihrer Patienten, während BUCHER (1965) sie bei 63 % der Patienten fand (s.Tab. 3). Ihr durchschnitt-

liches Vorkommen bei den erwähnten 10 Autoren beträgt 30 %.

Wenn man jedoch den Befund von BUCHER einmal ausser Acht lässt, und die Autoren mit einem sehr grossen Patientengut heranzieht, hat man den Eindruck, dass das Vorkommen von Pneumokokken im Laufe der Jahre zurückgegangen ist. So fand THURNER (1950) bei einem Kollektiv von 736 Patienten Pneumokokken bei 60 % der Patienten. FINDEISEN u. Mitarb. (1962) hingegen, die ihre Untersuchungen 12 Jahre später durchführten, fanden nur noch bei 7 % von 747 Pneumokokken.

Dieser Rückgang ist vielleicht mit der ausserordentlich grossen Empfindlichkeit der Pneumokokken gegenüber Penicillin erklärbar.

Wir fanden Pneumokokken bei nur 5,6 % der Patienten. Bei 4 von insgesamt 6 untersuchten Patienten fanden wir erhöhte Titer, die auf das Vorhandensein spezifischer Antikörper hinweisen. Die bei einem Patienten vorgenommenen 5 Verlaufskontrollen ergaben einen über 45 Tage fast gleichbleibenden Titer von 128.

Zusammenfassend kann man sagen, dass wir Pneumokokken zwar relativ selten aus dem Bronchialsekret anzüchten konnten, dass aber aufgrund der erhöhten Titer eine Beteiligung des Keimes am Krankheitsbild der chronischen Bronchitis angenommen werden muss. Unklar bleibt, warum der Antikörpertiter trotz der guten therapeutischen Beeinflussbarkeit des Keimes über einen so langen Zeitraum hin unverändert hoch blieb.

c) Neisseria catarrhalis

Das Vorkommen von Neisseria catarrhalis im Bronchialsekret berechnet sich auf durchschnittlich 3o %, wobei die Autorenangaben schwanken zwischen O % (BRUMFITT u. Mitarb. 1957; LEES u. Mitarb. 1959) und 88 % (MAY 1958).

Der Keim wird im allgemeinen nicht für pathogen gehalten, und sein Auftreten im Bronchialbaum als saprophytär gewertet.

BUCHER (1965) weist jedoch auf Beobachtungen hin, bei denen ihm die Beziehung zwischen dem Vorkommen von Neisseria catarrhalis im Bronchialsekret, und dem akuten Schub einer Bronchitis als eindeutig erschien, zumal sich nach dem Verschwinden des Keimes aus dem Sputum, nach Gabe von Penicillin V, eine eindeutige Besserung des klinischen Bildes ergab.

Wir fanden Neisseren bei 4o,4 % der Patienten, wobei auf das häufige Auftreten mit Streptokokkus viridans in meist nicht eitrigen Sputen bereits hingewiesen wurde.

Bei 33 untersuchten Patienten fanden wir nur in 2 Fällen einen geringgradig erhöhten Titer.

Sein relativ häufiges Vorkommen im Bronchialbaum, zusammen mit der offensichtlichen Unfähigkeit, im Körper Antikörper zu induzieren, mögen die allgemeine Auffassung erhärten, dass es sich bei Neisseria catarrhalis vorwiegend um einen apathogenen Begleitkeim handelt.

d) Staphylokokken

Staphylokokkus aureus und albus werden durchschnittlich bei 11 % der Patienten mit chronischer Bronchitis im Bronchialbaum gefunden. Nur der koagulase-positive Staphylokokkus aureus wird im allgemeinen für pathogen gehalten. Wegen seiner besonderen Bedeutung im Rahmen des Hospitalismus hat BUCHER (1965) besondere Mühe darauf verwendet, die Rolle des Staphylokokkus aureus bei den unspezifischen Erkrankungen der tieferen Luftwege zu erforschen. Er kam zu dem Ergebnis, dass die im Rahmen einer chronischen Bronchitis nachgewiesenen Staphylokokken im allgemeinen als Begleitkeime anzusehen sind, da sie den chronischen bronchialen Infekt nicht maßgeblich unterhalten. Besonders unter Antibiotikabehandlung oder während eines Klinikaufenthaltes kann sich jedoch auf dem Boden einer chronischen Bronchitis leicht eine Staphylokokkenpneumonie entwickeln. So hatten von 38 Patienten mit Staphylokokkenpneumonie 22 eine chronische Bronchitis. Wegen dieser besonderen Gefährdung durch Spitalinfektion befürworten MURDOCH u. Mitarb. (1959) sogar eine Behandlung der chronischen Bronchitis zu Hause.

Wir konnten den Staphylokokkus aureus bei 4,6 % der untersuchten Patienten feststellen, und den Staphylokokkus albus bei 5,6 %. Bei beiden Keimen blieben die Titer so niedrig, dass ein Vorhandensein von Antikörpern nicht angenommen werden kann.

e) Proteus, Clostr., Pseudomonas, E. Coli und Klebsiella

Angaben über das Gesamtvorkommen dieser Keime im Bronchialbaum chronischer Bronchitiker schwanken zwischen 41 % (THURNER 1950) u. 1? % (LEES u.Mitarb. 1957).

Das durchschnittliche Vorkommen aus den Ergebnissen von 7 Autoren liegt bei etwa 25 %.

Wir fanden diese Keime bei insgesamt 27 % der untersuchten Patienten.

THOMAS u. GIBBS (1960), sowie BUCHER (1965) machen darauf aufmerksam, dass diese Erreger meist nur in sehr geringer Dichte im Ausstrich sowie in der Kultur nachgewiesen werden. Wir konnten diesen Befund nicht bestätigen. In den meisten Fällen fanden wir die Keime sowohl reichlich im Primärpräparat, als auch in relativ starker Dichte auf der Blut- und Endoplatte.

Obgleich mehrere Autoren (ASPIN u. Mitarb. 1960; GERNEZ - RIEUX u. Mitarb. 1964; LEIGH 1960; BUCHER 1965) die Beobachtung machten, dass die oben genannten Keime, insbesondere nach längerer Antibiotikabehandlung, vermehrt in den unteren Luftwegen angetroffen werden, so wurde ihnen bisher für die Unterhaltung des chronischen bronchitischen Infekts doch nur eine sehr geringe Bedeutung beigemessen. Dies mag zum Teil darauf beruhen, dass diese negativen Stäbchen oft in Begleitung von Keimen gefunden werden (Hämophilus influenzae, Pneumokokken), denen man nach herkömmlicher Auffassung eher geneigt war, die entscheidende pathogenetische Rolle zuzuschreiben.

Wir fanden jedoch gerade bei diesen Keimen die höchsten Antikörpertiter. Von 33 untersuchten Patienten wurden bei 23 Titer über 4 gegen einen dieser Keime gefunden. Das bedeutet, dass 69 % dieser Keime im Körper die Bildung von Antikörper induzierten.

Bei den Verlaufskontrollen wurde nur bei einem Patienten eine stärkere Titerschwankung festgestellt. Der plötzliche Titerabfall von 1o24 auf 2 mag mit der ge-

zielten antibiotischen Behandlung der Patientin zusammenhängen, ohne dass er damit jedoch geklärt wäre.

BRÜHL (1967) fand bei seinen bereits erwähnten Titerbestimmungen gegen E. coli ähnliche Titerabfälle, was er mit dem Wegfall des antigenen Reizes unter gezielter antibiotischer Therapie in Zusammenhang brachte.

Die besondere Bedeutung der Antikörpertiter gegen die vorgenannten Keime wird erst durch den Vergleich mit den Titern gegen die Keime offenbar, deren Bedeutung für die chronische Bronchitis als längst gesichert gilt. Ohne die Meinung derer antasten zu wollen, die Hämophilus influenzae und Pneumokokken für die wichtigsten Keime bei der chronischen Bronchitis ansehen, halten wir es auf Grund unserer Ergebnisse für gerechtfertigt, auch den Keimen E. coli, Pseudomonas, Klebsiella, Proteus und Cloaca eine bedeutsame Rolle in der Unterhaltung der chronisch-bronchitischen Infektion zuzuschreiben. Diese Keime verdienen klinisch auch deshalb besondere Aufmerksamkeit, weil sie auf Grund der grösseren Tendenz zu Resistenzentwicklungen, sowie der vielfach geringeren oder ganz fehlenden Empfindlichkeit gegen die bei der chronischen Bronchitis meist angewendeten Antibiotika und Chemotherapeutika, ein viel grösseres therapeutisches Problem darstellen, als zum Beispiel die Keime Hämophilus influenzae und Pneumokokken.

Ohne den Aussagewert von Empfindlichkeitstestungen in vitro überzubewerten, halten wir es auf Grund der offensichtlich zunehmenden Bedeutung der vorgenannten Keime für sehr sinnvoll, jede chronische Bronchitis erst nach Sputumkontrolle und eventueller Empfindlichkeitstestung gezielt antibiotisch zu behandeln.

f) Die übrigen Keime

Die sehr unterschiedlichen Angaben über das Vorkommen von Streptokokkus viridans im Bronchialsekret sind zweifellos auf Unterschiede in der Untersuchungstechnik zurückzuführen.

Da dieser Keim den Hauptanteil der normalen Mund- und Rachenflora ausmacht, ist seine Anzüchtung aus dem Sputum auch dann noch sehr kritisch zu bewerten, wenn es lege artis gewaschen wurde. Das gleichzeitig angefertigte Primärpräparat kann zwar oft darüber Auskunft geben, ob es sich um eine Verunreinigung handelt, aber immer ist das nicht möglich. Im Zweifelsfall wird man den Keim dann meist als aus dem Bronchialbaum kommend betrachten, wenn man nicht, wie BUCHER (1965), von vornherein eine Verunreinigung annimmt beim Auftreten von Gram-positiven Kettenkokken. Angaben über das Vorkommen von Streptokokkus viridans sind also sehr kritisch zu betrachten.

In der Literatur wird dem Keim nirgends eine für die chronische Bronchitis pathogene Bedeutung beigemessen. Leider konnten unsere Antikörpernachweismethoden für vergrünende Streptokokken nicht angewendet werden, so dass wir in dieser Frage keine weiteren Angaben machen können. Lediglich bei 2 Patienten, in deren Bronchialsekret Streptokokken der Gruppe D (Enterokokken) gefunden worden waren, bestimmten wir den Antikörpertiter. Es wurde jedoch in beiden Fällen keine Agglutination beobachtet.

Auch die Herkunft von Hefe aus dem Bronchialbaum muss trotz sorgfältiger Technik sehr kritisch betrachtet werden. BUHL u.Mitarb. (1959) züchteten zwar aus 182 bei der Routinebronchuskopie aspirierten Sekreten 29 mal Pilze, ohne dass jedoch in einem einzigen Fall klinisch

eine Pilzinfektion vorlag. Wie bei den vergrünenden Streptokokken, so ist auch hier die Gefahr der Verunreinigung durch die Rachen- und Mundflora sehr gross, und auch bei Verwendung eines Bronchoskops nicht ganz auszuschliessen.

In der Literatur wird dem Keim für die chronisch-bronchitische Infektion auch keinerlei Bedeutung beigemessen, wenngleich bekannt ist, dass bei schwerkranken abwehrschwachen Patienten besonders nach einer Antibiotikabehandlung eine pulmonale Pilzinfektion auftreten kann.

Für den Nachweis eventuell vorhandener Antikörper gegen Hefepilze waren unsere Methoden ebenfalls nicht geeignet.

Schliesslich seien noch die negativen Stäbchen erwähnt, die wir nicht identifizieren konnten. In allen 13 Fällen handelte es sich um einen Keim mit folgenden Eigenschaften:

Grampräparat:	Vollschlanke, mittelgrosse, Gram-negative Stäbchen.
Blutplatte:	Mittelgrosse, runde, weisslich-graue Kolonien.
Endoplatte:	Mittel-grosse, runde, rosa Kolonien; nur ganz schwach Lactose positiv.
Bunte Reihe:	Glukose Säure und Gas ø, Lactose ø (nach 2-3 Tagen leicht positiv), H_2S ø, Mannit Säure und Gas ø, Indol ø, Methylrot ø, Voges-Proskauer Citrat positiv, Gelatine ø, Inosit ø. (Also ausser Citrat alles negativ).
Oxydase:	negativ
Urease:	negativ
Beweglichkeit:	Bei 22 und 37° C gute Beweglichkeit.

Bei keinem der 13 Fälle wurde ein nennenswerter Antikörpertiter gefunden, was dafür spricht, dass die Keime für die bronchitische Infektion ohne besondere Bedeutung waren.

4. Zusammenfassende Beurteilung der Bakterien

Fasst man die Ergebnisse über das Vorkommen der Bakterien im Bronchialbaum, sowie ihre Fähigkeit, Antikörper zu induzieren, zusammen, so lassen sich die Keime in 2 Gruppen einteilen:

Die erste Gruppe umfasst die Keime, gegen die keine (bzw. fast keine) Antikörper gefunden wurden. Es sind dies die Neisserien, die nicht identifizierbaren negativen Stäbchen, Staphylokokkus albus, Staphylokokkus aureus und die Enterokokken.

Die zweite Gruppe umfasst die Keime, gegen die in der Mehrzahl der Fälle Titer gefunden wurden, die auf das Vorhandensein spezifischer Antikörper hinweisen. Es sind Hämophilus influenzae, Pneumokokken, E. coli, Pseudomonas, Cloaca, Klebsiella und Proteus.

Vergleicht man innerhalb der zweiten Gruppe nochmals die Keime Haemophilus influenzae und Pneumokokken mit den restlichen (negativen Stäbchen), so ergibt sich, dass den letzteren auf Grund der von uns geprüften Kriterien (Häufigkeit des Vorkommens im Bronchialbaum, sowie die Fähigkeit, Antikörper im Organismus zu induzieren) zumindest die gleiche Bedeutung für die Unterhaltung des chronisch-bronchitischen Infektes beigemessen werden muss wie den Keimen Hämophilus influenzae und D. pneumoniae.

5. Die Gammaglobuline

Unsere sich auf Untersuchungen von GERNEZ-RIEUX u.Mitarb. (1966) stützende Vermutung, bei Entzündungen des Respirationstraktes vermehrt Immunglobuline der Klasse A vorzufinden, konnte bei den 5 vorgenommenen Unter-

suchungen nicht bestätigt werden.

Wir fanden in 3 Fällen ein Vorherrschen der Immunglobuline G, in je einem Fall ein Vorherrschen der Immunglobuline M und Immunglobuline A.

6. Das Komplement

In Analogie zu der Tatsache, dass bei der Reaktion der Antikörper mit bakteriellen Antigenen Komplement "verbraucht" wird (ROTHER u. Mitarb. 1964 u.a.), konnten UNANUE u. Mitarb. (1964) bei Patienten im akuten Stadium einer Glomerulonephritis signifikant erniedrigte Komplementtiter feststellen. Im chronischen Stadium der Glomerulonephritis waren die C'-Titer hingegen teils erniedrigt und teils im Bereich der Norm, so dass WEST u. Mitarb. (1965) zwischen einer hypokomplementämischen und normokomplementämischen Glomerulonephritis unterschieden.

Es wäre somit zu erwarten gewesen, dass auch bei der chronischen Bronchitis ein erhöhter Antikörpertiter mit einem erniedrigten C'-Titer einhergeht. Bei den Einmalkontrollen konnte in der Tat die Tendenz eines solch gegenläufigen Verhaltens der beiden Titer festgestellt werden (Im Gegensatz zu den C'-Titern der Verlaufskontrollen wurden die C'-Titer der Einmalbestimmungen nicht von den Verfassern dieser Dissertation bestimmt, weswegen die Ergebnisse an dieser Stelle nicht erscheinen können. Wir verweisen auf die bereits erfolgte Veröffentlichung: TUNN u. Mitarb. 1968).

Bei den Verlaufskontrollen hingegen war ein solch gegenläufiges Verhalten der AK- und C'-Titer nur bei

einer Patientin zu beobachten. Jedoch war dies auch die einzige Patientin, die grössere AK-Titerschwankungen aufwies. Bei den anderen Patienten waren keine oder nur geringe Schwankungen der AK-Titer festzustellen, so dass eine Aussage über das Verhalten der C4-Titer ohnehin kaum möglich ist.

VI. Zusammenfassung

Einzige Kriterien zur Beurteilung der Pathogenität von Bakterien bei der chronischen Bronchitis sind

a) die Häufigkeit und Dichte, mit der bestimmte Keime im Bronchialsekret gefunden werden,

b) das Verschwinden der Keime aus dem Bronchialbaum, zusammen mit einer Besserung des klinischen Krankheitsbildes nach Gabe von Antibiotika.

Diese Kriterien reichten jedoch für eine einheitliche Beurteilung der Pathogenität der einzelnen Keime offensichtlich nicht aus: Während zwar den Keimen Hämophilus influenzae und D. pneumoniae von fast allen Autoren eine pathogene Bedeutung bei der chronischen Bronchitis beigemessen wird, gehen die Meinungen bei der Beurteilung der übrigen Keime weit auseinander.

Es schien deshalb interessant zu prüfen, ob sich vielleicht durch den Nachweis spezifischer bakterieller Serumantikörper ein weiteres Kriterium für die Pathogenität der einzelnen Keime ergeben könnte.

Wir gingen dabei von der bekannten Tatsache aus, dass die Fähigkeit bakterieller Keime, unter natürlichen Infektionsbedingungen spezifische immunbiologische Reaktionen hervorzurufen, als ein Kriterium für ihre Pathogenität gedeutet werden kann.

1. Bei 93 Einmalbestimmungen mit Hilfe der indirekten (passiven) Hämagglutination wurden Antikörper gefunden gegen die Keime Hämophilus influenzae, D. pneumoniae, E. coli, Pseudomonas, Proteus, Klebsiella und Cloaca.

   Keine Antikörper hingegen wurden gefunden gegen die Keime Neisseriacea, nicht identifizierte negative Stäbchen, Staphylokokkus albus, Staphylokokkus aureus und Enterokokken. Die coliformen Stäbchen (E. coli, Pseudomonas, Proteus, Klebsiella und Cloaca) wurden in ihrer Gesamtheit öfters im Bronchialsekret gefunden und hatten auch im Durchschnitt höhere Antikörpertiter, als die Keime Hämophilus influenzae und D. pneumoniae.

2. Bei weiteren 8 Patienten, bei denen Antikörper gefunden worden waren gegen Hämophilus influenzae, D. pneumoniae, E. coli, Pseudomonas, Proteus, Cloaca und Achromobacter wurden mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie Verlaufskontrollen der Antikörpertiter vorgenommen. Nur bei einer Patientin konnten dabei grössere Titerschwankungen festgestellt werden.

3. Bei 5 von diesen 8 Patienten wurden ferner die Immunglobulinfraktionen fluoreszenzmikroskopisch bestimmt. Dreimal war die IgG-Fraktion am stärksten vertreten und je einmal die IgM-und IgA-Fraktionen.

4. Bei 7 Patienten wurden neben den Verlaufskontrollen der Antikörpertiter auch noch Verlaufskontrollen der Komplementtiter gemacht, um eventuelle Gesetzmäßigkeiten im Verhalten beider Titer zueinander festzustellen.

   Nur in einem Fall, bei dem die Antikörpertiter grössere Schwankungen aufwiesen, konnte ein gegenläufiges Verhalten der Komplementtiter beobachtet werden. Bei den übrigen 6 Patienten sind Aussagen nicht möglich, da die Antikörpertiter keine oder nur geringe Schwankungen aufwiesen.

VII. Autorenverzeichnis

Amies, C.R. "The envelope substance of Pasteurella pestis", Brit. J. Exper, Path. 32: 259, (1951)

Aspin, J. and Howells, C.H.L.: "Chemotherapy in chronic bronchitis", Lancet ii: 872, (1960)

Ballenger, J.J.: "Experimental effect of zigarette smoke on human respiratory cilia", N. England J. Med. 263: 2832, (1960).

Betke, K., Savelsberg, W.: "Stufenphotometrische Hämoglobinbestimmung mittels Cyanhämoglobin", Biochem. Z. 320: 431-39, (1950).

Bopp, K.Ph.:"Chronische Bronchitis - Wesen, Ursachen, Unklarheiten", Medical Tribune 12: 11 (1968).

Brühl, P., Trendelenburg, F., Genser, N., "Nachweis bakterieller Serumantikörper bei chronischer Bronchitis", Med. Thorac. 24: 384 (1967).

Brumfitt, W., Willoughby, M.L.N. and Bromley, L.L.: "An evaluation of sputum examination in chronic bronchitis", Lancet ii: 1306-09 (1957).

Bucher, Urs:"Die Erkennung bronchialer Infekte im ausgewaschenen Sputum", Helv. med. Acta 27: 741-47, (1960).

Bucher, Urs:"Die Sputumuntersuchung bei unspezifischen Krankheiten der tiefen Luftwege", Bern und Stuttgart, Verlag Hans Huber (1965).

Buhl, K. and Stenderup, A.: "The occurrence of fungi in the bronchial secretion", Acta tuberc. Scand. Suppl. 47: 55-59, (1959).

Coons, A.H.: "Labelled antigens and antibodies", Ann. Rev. Microbiol. 8: 333-52, (1964).

Coons, A.H.: "Fluorescent Antibody Methods", General Cytochemical Methods 1: 399-422, (1958).

Coons, A.H.: "Antibodies and antigens labelled with fluorescein", Schweiz. Z. allg. Path. 22: 693-99, (1959).

Coons, A.H.: "Immunofluorescence", Pub. Health. Rep. 75: 937-43, (1960).

Correll Jr., N.O., Johnston, K.C., Langston, H.T. and Hubble, R.H.: "The bacterial flora of the human tracheobronchial tree", J. Thorac. Surg. 37: 367-70, (1959).

Elmes, P.C., Dutton, A.A.C. and Fletcher, C.M.: "Sputum examination and the investigation of chronic bronchitis", Lancet i: 1241-44, (1959).

Findeisen, D.G.R. und Mitarb.: "Zur Diagnose und Therapie der bakteriellen Allergie der tieferen Luftwege", Allergie und Asthma, 8: 202-13, (1962).

Fletcher, C.M.:"Definition und Classification of Bronchitis, Asthma und Emphysema", In Orie, N.G.M. and Sluiter H.J.: Bronchitis; an International Symposium, 27-29 april 1960, University of groningen. Royal VanGorcum, Assen (1961).

Fox, R.E., Dowling, H.F., Saxton, G.A. and Mellody, M.: "Treatment of chronic bronchitis and bronchiectasis with intravenous tetracycline", Arch. intern. Med. 100: 11-17, (1959).

Francis, A.B., May, J.R. and Spicer, C.C.: "Influence of Daily Penicillin, Tetracycline, Erythromycin and Sulphamethoxypyridazine on Exacerbations of Bronchitis", Brit. med. J.I: 728-32, (1964).

Gernez-Rieux, Ch., Voisin, C., Havez, R., Wattel, F., Aerts, C.: "Derzeitige Konzeption von der Infektion bei der chronischen Bronchitis", EGKS Symposium Bronchitis-Emphysem, 57-71, (1967).

Gernez-Rieux, Ch., Voisin, C., Wattel, F. et Mahieu, P.: "Problèmes bactériologiques de la bronchite chronique", Poumon Coeur 7: 677, (1954).

Glynn, A.A.: "Antibodies to haemophilus influenzae in chronic bronchitis", Brit. Med. J. ii: 911-14, (1959).

Glynn, A.A. and Michaels, L.: "Bronchial biopsy in chronic bronchitis and asthma", Thorax 15: 132-[illegible], (1960).

Goslings, W.R.O., Valkenburg, H.A. and Los, W.: "Antibiotic treatment of chronic infected bronchitis", In Orie, N.G.M. and Sluiter, H.J.: Bronchitis; an International Symposium, Univ. of Groningen. Royal VanGorcum, Assen (1961).

Gregorczyk, K.: "Vorkommen, Nachweis und Bedeutung fluoreszenzoptisch erfassbarer Treponemen-Antikörper bei der Syphilis", Ärztliches Laboratorium, 8: 221- 37, (1960),
" " 9: 253- 75, "
" " 10: 298-311, "
" " 11: 329- 36, "

Harms, H.: "Die Chemie der Markierungs(farb)stoffe", Acta Histochemica, Supplementband 7: 149-66, (1967).

Harris, T.N. and Harris, S.: "Agglutination by human sera of erythrocytes incubated with strebtococcal culture concentrates", J. Bacter. 66: 159, (1953).

Herberg, Dieter: "Langzeitbehandlung der chronischen Bronchitis", Dtsch. Med. J. 16:473-77 (1966).

Hers, J.F.P. and Mulder, J.: "The mucosal epithelium of the respiratory tract in mucopurulent bronchitis caused by haemophilus influenzae", J. Path. Bact. 66: 1o3-o8, (1953).

Herzog, H.: "Langzeittnerapie unspezifischer chronischer Lungenkrankheiten", Schweiz. Med. Wschr. 95: 571-78, (1965).

Hoender, H.J., von Doorenmalen, W.J., Heemskerk, E.: "Reinigung und spektrale Eigenschaften von Fluoresceinisocyanat", Acta Histochemica, Supplementband 7: 199-2o8, (1967).

Howell, T.H.: "Chronic bronchitis", London, Butterworth and Co., (1951).

Humphrey, J.H. and Joules, H.: "Penicillin inhalation in pulmonary Disease", Lancet 2: 221-27, (1946).

Keogh, E.V., North, E.A. and Warburton, M.E.: "Hemagglutinins of the hemophilus group", Nature 16o: 63, (1947).

Kitasato, S.: "Gewinnung von Reinculturen der Tuberkelbacillen und anderer pathogener Bacterien aus Sputum", Z. Hyg. Infekt.-Kr. 11: 441-44, (1892).
Referiert nach Bucher, U.: "Die Sputumuntersuchung bei unspezifischen Krankheiten der tiefen Luftwege", Bern und Stuttgart, Verlag Hans Huber (1965).

Kortekangas, A.E.: "Review of earlier studies on the bacterial flora of the bronchial tree", Acta otolaryng. (Stockh.) Suppl. 15o: 1-169, (1959).

Landsteiner, Karl: "The Specificity of Serological Reactions", New York, Dover Publications, Inc., (1962).

Lederberg, J.: "Genes and antibodies", Science 129: 1649-55, (1959).

Lees, A.W. and Mc Naught, W.: "Bacteriology of lower-respiratory-tract secretions, sputum, and upper-respiratory tract secretions in normals and chronic bronchitis", Lancet, ii: 1112-1115, (1959).

Leigh, A.E.D.: "Chemotherapy of chronic bronchitis", Lancet 2: 1087, (1960).

Lüderitz, O., Westphal, O., Eichenberger, E. und Neter, E.: "Über die Komplexbildung von bakteriellen Lipopolysacchariden mit Proteinen und Lipoiden", Biochem.Zeitschr., Bd. 330: 21-33, (1958a).

Lüderitz, O., Westphal, O., Sievers, K., Kröger, E., Neter, E. und Braun, O.H.: "Über die Fixation von P^{32}-markiertem Lipopolysaccharid (Endotoxin) aus Escherichia coli an menschlichen Erythrocyten", Biochem. Zeitschr., Bd. 330: 34-46, (1958b).

May, J.R.: "The bacteriology of chronic bronchitis", Lancet ii: 594-97, (1953).

May, J.R.: "Antibodies to Haemophilus influenzae in the sera of patients with chronic bronchitis", Path. Bact. - Vol. 90: 163-74, (1965).

Mayer, M.M.: "Complement and Complementfixation", In: Kabat and Mayers Experimental immunochemistry, II. ed. p. 133-240, Springfield (Ill.): Ch. C. Thomas (1961).

Middlebrook, G., and Dubos, R.J.: "Specific serum agglutination of erythrocytes sensitized with extracts of tubercle bacilli", J. Exper. Med. 88: 521, (1948).

Miller, W.F.: "Chronic inflammatory bronchopulmonary disorders", Arch. intern. Med. 107: 589-605, (1961).

Mulder, J.: "Bacteriological examination of sputum in cases of acute and chronic bronchitis", In Orie, N N.G.M. and Sluiter H.J.: Bronchitis; an International Symposium, 27-29 april 1960, University of Groningen, Royal VanGorcum, Assen (1961).

Murdoch, J. McC., Leckie, W.J.H., Downie, J., Swain, R.H.A. and Gould, J.C.: "An evaluation of continuous antibiotic therapy in chronic bronchitis", Brit. med. J. ii: 1277-85, (1959).

Neter, E., Bertram, L.F. and Arbesman, D.E.: "Demonstration of Escherichia coli o55 and o 111 antigens by means of hemagglutination test", Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. 79: 255, (1952).

Neter, E., "Bacterial Hemagglutination and Hemolysis", Bact. Rev. 2o: 166-88, (1956).

Neter, E.: "Indirect Bacterial Hemagglutination, and its Application to the Study of Bacterial Antigens and Serologic Diagnosis", Path. Microbiol. 28: 859-77, (1965).

Neville, O.M.D.: "Modern day treatment of chronic bronchitis", Geriatrics, 125-132, (1967).

Protivinsky, R.: "Die chronische Bronchitis und das obstruktive Lungenemphysem", Der Landarzt 25: 1o88-95, (1968).

Reid, L.: "Chronic bronchitis and hypersecretion of mucus", Lectures on the Scientific Basis of Medicine Vol. 8, 1958-59 series, p. 235. Athlone Press, London (1960).

Roemer, G.B.: "Untersuchungen über den Nachweis von Streptokokkenantikörpern mit Hilfe der indirekten Hämagglutination", Zeitschr. f. Hygiene 143: 445-59, (1957).

Roemer, G.B. und Mai, K.: "Antikörpernachweis bei Enterokokken-Infektionen des Menschen durch indirekte Hämagglutination", Zeitschr. f. Hygiene 147: 109-22, (1960).

Roemer, G.B. und Mai, K.: "Über das Vorkommen spezifischer Antikörper bei Harnwegsinfektionen durch Enterokokken", Zeitschr. f. Hygiene 147: 246-56, (1961).

Rother, K., Rother, U., Peterson, K.F., Gemsa, D. and Mitze, F.: "Immune bactericidal activity of complement. Separation and description of intermediate steps", J. Immunol. 93: 319-30, (1964).

Sachse, H.: "Über die Agglutinierbarkeit mit Fuller-Extrakten von Streptokokken beladener Erythrocyten durch Kaninchen-Immunseren", Arch. f. Hyg. 139: 224, (1955).

Scherrer, M.: "Die Infektion der tiefen Luftwege bei chronischer Asthmabronchitis", Schweiz. med. Wschr. 88: 896-07, (1958).

Schmidt, Otto-Peter: "Das Bronchitische Syndrom", München, J.F. Lehmanns Verlag (1965).

Thomas, C.G.A. and Gibbs, F.J.: "Misleading sputum cartons", J. clin. Path. 13: 261-63, (1960).

Thurner, W.: "Die bakteriologische Sputumuntersuchung und deren Bedeutung für die Erkrankung der Atmungswege", Dtsch. med. Wschr. 75: 1468-71, (1950).

Tunn, U.W., Kronenbürger, R. und Huber ".: "Komplement- und Antikörper-Titer bei Patienten mit chronischer Bronchitis", Klinische Wochenschr. 16: 903-04, (1968).

Unanue, E. and Dixon, F.D.: "Experimental glomerulonephritis. IV. Participation of complement in nephrotoxic nephritis", J. Exp. Med. 119: 965-82, (1964).

Vogt, A.: "Sandwich-Methoden", Acta Histochemica, Supplementband 7: 289-98, (1967).

West, C.D., McAdams, A.J., Conville, J.M., Davis, N.C. and Holland, N.H.: "Hypocomplementemic and normocomplementemic persistent (chronic) glomerulonephritis; clinical and pathologic characteristics", J. Pediatrics 67: 1089-1112, (1965).

Westphal, O. und Lüderitz, O.: "Chrmische Erforschung von Lipopolysacchariden gramnegativer Bakterien", Angew. Chem. 66: 407-17, (1954).

Wilson, G.S. and Miles, A.A.: "In Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and Immunology", 4th ed., vol. 1, Arnold, London (1955).

Wilson, W.J., Dunn, J.H. and Blair, E.M.: "Agglutinins for Pfeiffer's bacillus found in the sera of patients suffering from influenzae and other diseases", "J. Path. Bact. 27: 336-42, (1924).

Wood, S.H., Buddingh, G.J. and Abberger, B.F.: "An inquiry into the etiology of acute Bronchiolitis of infants", Pediatrics 13: 363-72, (1954).

Die theoretischen und experimentellen Untersuchungen wurden im Rahmen eines Promotionsstipendiums der Europäischen Gemeinschaft für Kohle und Stahl, Hohe Behörde, innerhalb des dritten Forschungsprogramms " Physiopathologie und Klinik " durchgeführt. Für die Bewilligung des Stipendiums möchten wir der Hohen Behörde unseren verbindlichsten Dank sagen.

Herrn Prof. Dr. med., Dr. phil., Dipl.-Chem. W. ZIMMERMANN danken wir herzlich für die Überlassung der Arbeit, sowie für die vielen Ratschläge und Anregungen während der Untersuchungen.

Herrn Chefarzt, Priv. Doz. Dr. med. K. GREGORCZYK sind wir für die Einarbeitung in die fluoreszenzmikroskopische Untersuchungsmethode und für die zahlreichen Anregungen sehr dankbar.

Weiterhin danken wir Herrn Chefarzt Dr. med. O.P. SCHMIDT für seine großzügige Unterstützung während unserer Untersuchungen im " Sanatorium Trausnitz " in Bad Reichenhall.

Für die Einarbeitung in die Komplementbestimmung sind wir Herrn Dr. med. U. TUNN zu Dank verpflichtet.

Lebenslauf: Rolf Kronenbürger

4. 8. 1941	Geburt in Eich/Krs. Mayen als Sohn von Karl Kronenbürger und seiner Ehefrau Gertrud, geb. Amann.
1947-1955	Besuch der Volksschule in Wassenach/Krs. Mayen.
1955-1960	Lehrling und Assistent bei der Deutschen Bundesbahn.
1960-1964	Besuch des Abendgymnasiums in Mainz mit Erwerb des Reifezeugnisses.
1964-1966	Vorklinisches Studium an der Joh. Gutenberg Universität in Mainz.
1966-1969	Klinisches Studium an der Universität des Saarlandes in Homburg/Saar.
1965	Vorphysikum
1966	Physikum
1969	Staatsexamen

Lebenslauf: Walter Huber

6.11. 1941	Geburt in Biberach/Riss als Sohn des Facharztes f. Chirurgie Dr. med. W. Huber und seiner Ehefrau Dr. med. Hildegard, geb. Liess.
1947-1951	Volksschule in Wasserburg/Bodensee.
1951-1961	Besuch des Gymnasiums in Lindau/Bodensee.
1961-1963	Ableistung des Wehrdienstes.
1963-1964	Studium der Tiermedizin bis zum Vorphysikum an der Ludw. Max. Universität in München.
1964-1969	Studium der Medizin an der Universität des Saarlandes in Homburg/Saar.
1966	Physikum
1969	Staatsexamen